

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

DIPLOMOVÁ PRÁCE



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA ELEKTROTECHNIKY
A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ**

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

**ANALÝZA VLIVU TRÉNOVACÍ DATOVÉ SADY NA
ÚSPĚŠNOST SEGMENTACE**

ANALYSIS OF TRAINING DATASET INFLUENCE ON THE EFFICIENCY OF SEGMENTATION

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Veronika Benešová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Roman Jakubíček, Ph.D.

BRNO 2021

Diplomová práce

magisterský navazující studijní program **Biomedicínské inženýrství a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

Studentka: Bc. Veronika Benešová

ID: 195724

Ročník: 2

Akademický rok: 2020/21

NÁZEV TÉMATU:

Analýza vlivu trénovací datové sady na úspěšnost segmentace

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Seznamte se s problematikou kultivace buněčných kolonií na Petriho miskách, jejich přípravou a akvizicí. 2) Proveďte literární rešerši problematiky segmentace snímků Petriho misek za pomoci algoritmů hlubokého učení. Proveďte literární rešerši zkoumající vliv parametrů datové množiny na výsledek trénování modelů strojového učení. 3) Vytvořte a popište dostatečně rozsáhlou sadu anotovaných dat a vyberte vhodné metriky pro hodnocení kvality použitého segmentačního modelu. 4) Na základě poznatků z rešerše navrhnete alespoň pět experimentů analyzujících vliv kvalitativních a kvantitativních parametrů trénovací množiny na úspěšnost segmentace modelu. 5) Proveďte navržené experimenty na vytvořené datové sadě s využitím dostupného segmentačního modelu hlubokého učení. S využitím zvolených metrik a navržené metodiky hodnocení analyzujte výsledky z dílčích experimentů. 6) Diskutujte dosažené výsledky a zhodnoťte jejich využitelnost pro praxi.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] HORWATH, James P., Dmitri N. ZAKHAROV, Rémi MÉGRET a Eric A. STACH. Understanding important features of deep learning models for segmentation of high-resolution transmission electron microscopy images. *Npj Computational Materials*. 2020, 6(1).

[2] RONNEBERGER, Olaf, Philipp FISCHER a Thomas BROX. U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation., 234.

Termín zadání: 8.2.2021

Termín odevzdání: 21.5.2021

Vedoucí práce: Ing. Roman Jakubíček, Ph.D.

Konzultant: Ing. et Ing. Jan Karásek, PhD.

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
předseda rady studijního programu

UPOZORNĚNÍ:

Autor diplomové práce nesmí při vytváření diplomové práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

ABSTRAKT

Mikrobiální struktury jsou v každém živém organismu, proto je důležité je klasifikovat pro následné zkoumání jejich původu a funkce. Společnost Bruker, s.r.o. vyvíjí právě pro tento účel přístroj MBT Pathfinder, který automatizuje přenos kolonií na MALDI destičky, kde probíhá následná analýza vzorku. Přenášené kolonie lze vybrat ručně nebo pomocí algoritmu, který zajistí automatickou segmentaci kolonií. Tento algoritmus je nejdříve potřeba naučit na trénovací množině, která má velký vliv na jeho přesnost. Tato práce se zabývá měřením vlivu datové sady na přesnost tohoto algoritmu.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mikrobiální kultury, hluboké učení, segmentace, experimenty, datová sada.

ABSTRACT

Microbial structures are present in every living organism, so it is important to classify them for subsequent research of their origin and function. Bruker, s.r.o. is developing the MBT Pathfinder for this purpose, which automates the transfer of colonies to MALDI plates, where the subsequent analysis of the sample takes place. Transferred colonies can be selected manually or using an algorithm that ensures automatic colony segmentation. This algorithm must be learned on a training set, which has huge influence on its accuracy. This work deals with measuring the influence of a dataset on the accuracy of this learning algorithm.

KEYWORDS

Microbial cultures, deep learning, segmentation, experiments, dataset.

BENEŠOVSKÁ, Veronika. *Analýza vlivu trénovací datové sady na úspěšnost segmentace*. Brno, 2021, 62 s. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav biomedicínského inženýrství. Vedoucí práce: Ing. Roman Jakubíček, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svou diplomovou práci na téma „Analýza vlivu trénovací datové sady na úspěšnost segmentace“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této diplomové práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a/nebo majetkových a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

Brno

.....

podpis autorky

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkovala vedoucímu diplomové práce panu Ing. Romanu Jakubíčkoví, Ph.D. Ing. et Ing. Janu Karáskovi, Ph.D. a Ing. Václavu Uherovi, Ph.D. za odborné vedení, konzultace, trpělivost a podnětné návrhy k práci.

Obsah

Úvod	10
1 Mikrobiální kultury	11
1.1 Růst a množení mikroorganismů	11
1.1.1 Růst mikroorganismů	11
1.1.2 Množení mikroorganismů	11
1.2 Růstová média	13
1.2.1 Pevná média	13
1.2.2 Kapalná média	13
1.2.3 Polotuhá média	13
1.3 Analýza mikrobiálních struktur	14
1.3.1 Přímé metody	15
1.3.2 Nepřímé metody	16
2 Metody segmentace	17
2.1 Klasické segmentační algoritmy	17
2.1.1 Segmentace na základě parametrů obrazových pixelů	17
2.1.2 Regionově orientovaná segmentace	18
2.1.3 Hranově orientovaná segmentace	18
2.2 Segmentace s využitím strojového učení	18
2.2.1 Hluboké učení	19
3 Konvoluční neuronové sítě	20
3.1 Vrstvy konvolučních neuronových sítí	21
3.1.1 Konvoluční vrstva	21
3.1.2 Pooling vrstva	23
3.1.3 Plně propojená vrstva	23
3.2 Optimalizační metody	23
3.2.1 Adagrad	24
3.2.2 Adam	24
3.3 Regularizační metody	25
3.3.1 Augmentace dat	25
3.3.2 Dřívější ukončení	25
3.4 Architektury konvolučních neuronových sítí	26
3.4.1 AlexNet	27
3.4.2 VGGNet	27
3.4.3 GoogLeNet	27

3.4.4	ResNet	27
3.4.5	ENet	27
3.4.6	UNet	28
3.5	Segmentace obrazů Petriho misek	29
3.5.1	Segmentace pomocí hlubokého učení	30
3.5.2	Výhody segmentace pomocí hlubokého učení	30
3.5.3	Nevýhody segmentace pomocí hlubokého učení	30
4	Návrh metodiky experimentů a hodnocení	31
4.1	Datová sada	31
4.2	Vliv parametrů na trénování modelů strojového učení	32
4.3	Model sítě UNet	32
4.4	Metriky pro vyhodnocení výsledků modelů hlubokého učení	33
4.5	Formulace experimentů	35
5	Experimentální část	36
5.1	Experiment 1: Vliv velikosti trénovací množiny	36
5.1.1	Návrh experimentu	36
5.1.2	Metodika hodnocení	37
5.1.3	Výsledky experimentu	37
5.1.4	Závěr	40
5.2	Experiment 2: Vliv barvy agaru	41
5.2.1	Návrh experimentu	41
5.2.2	Metodika hodnocení	43
5.2.3	Výsledky experimentu	43
5.2.4	Závěr	44
5.3	Experiment 3: Vliv tvaru kolonie	45
5.3.1	Návrh experimentu	46
5.3.2	Metodika hodnocení	47
5.3.3	Výsledky experimentu	48
5.3.4	Závěr	49
5.4	Experiment 4: Vliv okolí misky	50
5.4.1	Návrh experimentu	51
5.4.2	Metodika hodnocení	52
5.4.3	Výsledky experimentu	52
5.4.4	Závěr	53
5.5	Experiment 5: Vliv rozdělení datové sady při trénování modelu	53
5.5.1	Návrh experimentu	54
5.5.2	Metodika hodnocení	55

5.5.3	Výsledky experimentu	55
5.5.4	Závěr	55
5.6	Finální zhodnocení výsledků	56
Závěr		57
Literatura		58
Seznam symbolů, veličin a zkratk		62

Seznam obrázků

1.1	Růstová křivka	12
1.2	Mikrobiální kultura v polotuhém médiu	14
3.1	Princip konvoluce[12]	22
3.2	Princip transponované konvoluce[30]	22
3.3	Princip dřívějšího ukončení trénování modelu	26
3.4	Architektura sítě U-Net	29
4.1	Snímek z datasetu a jeho maska	31
5.1	Segmentace obrazu při použití 10 % datové sady experimentu	38
5.2	Segmentace obrazu při použití celé datové sady experimentu	39
5.3	Hodnoty F1 skóre modelů prvního experimentu	40
5.4	Příklad snímků použitých v druhém experimentu	41
5.5	Grafický výstup prvního modelu druhého experimentu	44
5.6	Grafický výstup druhého modelu druhého experimentu	45
5.7	Příklad snímků použitých ve třetím experimentu	46
5.8	Grafický výstup prvního modelu třetího experimentu	49
5.9	Grafický výstup druhého modelu třetího experimentu	50
5.10	Příklad snímků použitých ve čtvrtém experimentu	52

Úvod

Mikrobiální kultury se nachází v každém živém organismu, proto je důležité je klasifikovat pro další rozbor při zjišťování jejich původu a funkce. Pomocí kultivace je možné rozmnožit získané vzorky mikroorganismů v in vitro podmínkách za pomoci růstových médií. Takto kultivované kolonie lze následně analyzovat odborným pracovníkem nebo za využití přístrojové analýzy.

Dříve byly k segmentaci a klasifikaci kultivovaných kolonií v Petriho miskách často používány klasické přístupy, jako je například segmentace na základě parametrů obrazových pixelů, regionově orientovaná segmentace nebo hranově orientovaná segmentace. Nejnovější metody však používají čím dál tím více segmentaci za pomoci strojového učení, které zaručuje vyšší rychlost a přesnost výsledků. Často jsou používány algoritmy hlubokého učení a konvoluční neuronové sítě.

Společnost Bruker, s.r.o. vyvíjí přístroj s názvem MBT Pathfinder. Jeho úkolem je automatizace procesu transferu bakteriálních kolonií na MALDI destičky. Přístroj vybere misku a vloží ji na dané místo, kde je potřeba vybrat kolonii, která bude přemísťena. Tento proces lze provést manuálně na obrazovce, nebo je možné nechat vybrat kolonie algoritmem sloužícím pro zpracování a segmentaci kolonií na daném snímku misky. Tento algoritmus je naučený na omezeném počtu trénovacích dat. Práce se zabývá problematikou trénovací množiny, která je důležitá pro správné naučení modelu. Při použití příliš malého množství dat vzniká riziko přeučení modelu na daná data nebo následná nesprávná segmentace. Existuje mnoho parametrů, které se týkají vlivu datové sady na přesnost algoritmu hlubokého učení. Práce navrhuje několik experimentů, které se týkají právě těchto parametrů a sleduje jejich vliv na přesnost algoritmu strojového učení.

Cílem práce je zjistit vliv parametrů trénovací množiny na přesnost výsledného modelu pomocí vyhodnocení stanovených experimentů. Tento krok je důležitou součástí při tvorbě algoritmu pro zpracování snímku Petriho misky a následnou segmentaci kolonií, která je důležitá při výběru kolonie přesouvané na MALDI destičku. Vytvoření co nejlepší trénovací množiny bude mít velký efekt na přesnost samotného modelu při segmentaci kolonií. Výstup z této práce, tedy trénovací množina s ideálními parametry pro tento problém, bude zprostředkována společností Bruker, s.r.o. a použita pro algoritmus sloužící k automatické segmentaci kolonií. V budoucnosti se pak počítá s aktualizací trénovací množiny v případě, že se objeví úplně nový typ mikrobiálních kolonií na které bude nutné model naučit.

1 Mikrobiální kultury

Mikrobiální kultura se používá za účelem identifikace, případně pro testování, daného organismu. Pomocí kultivace se docílí rozmnožení cílených mikroorganismů¹ v podmínkách in vitro.² Celý proces probíhá za kontrolovaných laboratorních podmínek v připraveném živném roztoku, který se nazývá médium.[1]

Kultury se dělí na čisté, smíšené a technické. Za čistou kulturu se považuje ta, které je složena z jednoho druhu mikroorganismů. Smíšené jsou pak ty, které tvoří více druhů. Typickým příkladem jsou izoláty z přirozeného prostředí, které je potřeba pro identifikaci izolovat. Technickými kulturami jsou označovány kultury pro výzkumné nebo provozní účely. [26]

1.1 Růst a množení mikroorganismů

Následující kapitoly se zabývají růstem a množím mikroorganismů.

1.1.1 Růst mikroorganismů

Růstem mikroorganismu se rozumí situace, kdy se buňka nachází ve vhodném fyzikálně chemickém prostředí, přijímá živiny a syntetizuje sama sebe. Zvětšuje tím tak svou hmotnost i objem. Po dosažení určitého objemu a hmotnosti se pak buňka rozdělí na dvě dceřiné. Růst buňky záleží na:

- dostatku živin, které má k dispozici,
- prostředí kultivace (přirozené, in vitro),
- zda je kultivována čistá nebo směsná kultura,
- konzistenci prostředí (tekuté, pevné),
- homogenitě prostředí (homogenní- fermentor, nehomogenní- půda, voda).

Generační doba je čas, jenž je potřebný pro zdvojení počtu buněk. Během dělení pak získá každá buňka chromozom a dostatečný díl dalších složek, které potřebuje pro samostatný život. Buňky vzniklé dělením nejsou fyziologicky identické.[25]

1.1.2 Množení mikroorganismů

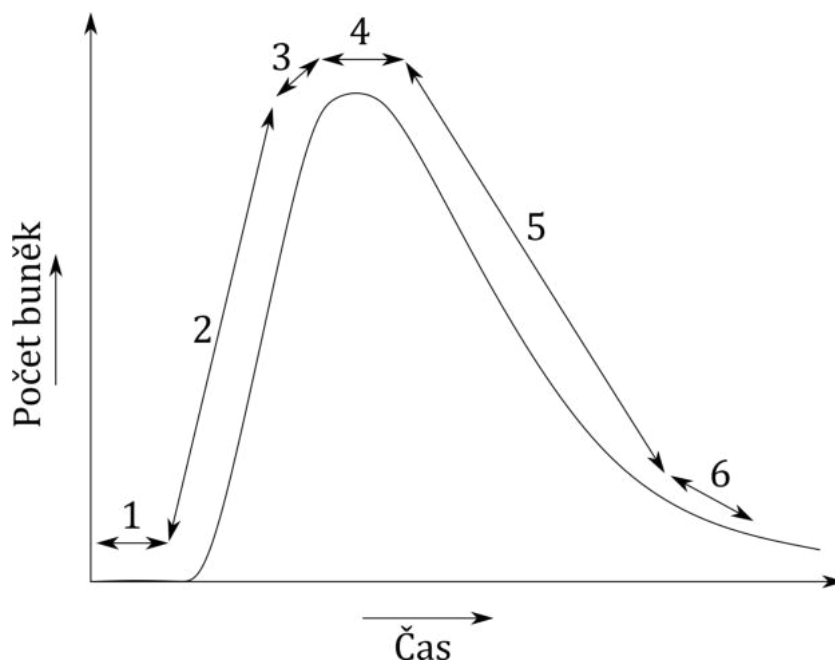
Tato kapitola se zabývá pouze růstem uzavřeného systému mikrobiální kultury v médiu. Typické množení mikroorganismů v podmínkách statické kultivace je možné vyjádřit růstovou křivkou, která je charakterizována šesti fázemi[42]:

¹Mikroorganismus je jednobuněčný, mikroskopicky pozorovatelný organismus. Mezi mikroorganismy se řadí prokaryota, plísňe, kvasinky a některé řasy a prvoci.

²Práce se vzorkem mimo živé tělo, ve zkumavce.

1. První fází je **Lag fáze**, kde se buňky většinou nemnoží, jen se přizpůsobují prostředí a syntetizují enzymy spolu s dalšími látkami, které jsou nezbytné pro rozdělení buňky.
2. Ve **fázi zrychleného růstu** jsou buňky již přizpůsobeny prostředí, dochází tedy k dělení. Při této fázi mají buňky vysokou citlivost k nepříznivým faktorům.
3. **Fáze logaritmická (exponenciální)** je fáze intenzivního růstu buněk, které narůstají geometrickou řadou. Naopak velmi malé množství buněk odumírá. Dochází k rychlému využívání substrátů a velké tvorbě metabolitů.
4. Ve čtvrté fázi dochází k zpomalování růstu (**fáze zpomaleného růstu**), zvyšování počtu odumírajících buněk kvůli nízké koncentraci živin a vysoké koncentraci metabolitů.
5. **Fáze stacionární** je fáze, kdy je dosaženo maximálního počtu buněk. Růstová rychlost je nulová díky tomu, že je stejný počet nově vznikajících a odumírajících buněk.
6. Ve **fázi poklesu** narůstá počet odumírajících buněk.
7. **Fáze zrychleného odumírání** pak reprezentuje situaci, kdy je rychlost dělení v minusových hodnotách a koncentrace živin pod limitní hodnotou. Postupně jsou odbourávány zásobní látky.[42][43]

Počet buněk v závislosti na čase reprezentuje ilustrační obrázek 1.1. [42] Číslo u šipek znázorňuje jednotlivé fáze popsané výše v odpovídajícím pořadí, jak se vyskytují v textu.



Obr. 1.1: Růstová křivka

1.2 Růstová média

Růstové médium je určené k podpoře růstu populace mikroorganismů. k pěstování různých typů buněk se používají různé typy médií.

Důležitým rozdílem mezi typy růstových médií je rozlišení definovaných a nedefinovaných médií. Definované médium bude mít známé množství všech složek. U mikroorganismů tyto složky spočívají v obsahu stopových prvků a vitamínů, které mikrob potřebuje k životu a také na definovaných zdrojích uhlíku a dusíku.

Nedefinované médium obsahuje často specifické složky, například kvasničný extrakt nebo kaseinový hydrolyzát, které se skládají ze směsi mnoha chemických látek v neznámých poměrech. Nedefinovaná média jsou někdy vybírána na základě ceny a někdy podle potřeby, některé mikroorganismy nebyly nikdy kultivovány na definovaných médiích. [6]

Nejběžnějším růstovým médiem pro mikroorganismy jsou živné půdy a agarové plotny. Některé organismy vyžadují speciální prostředí kvůli komplexním nutričním požadavkům. [22] Růstová média je možné dělit podle konzistence na pevná, kapalná a polotuhá.[1]

1.2.1 Pevná média

Pevná média jsou podobná agarovým plotnám. Na rozdíl od nich jsou však tvořena pevným agarem ve zkumavce. Mikroorganismy se zavádějí pomocí inokulační jehly nebo špičky pipety do středu agaru, kde v propíchnuté oblasti rostou. Pevná média se nejčastěji používají pro krátkodobé skladování nebo přepravu kultur.[22]

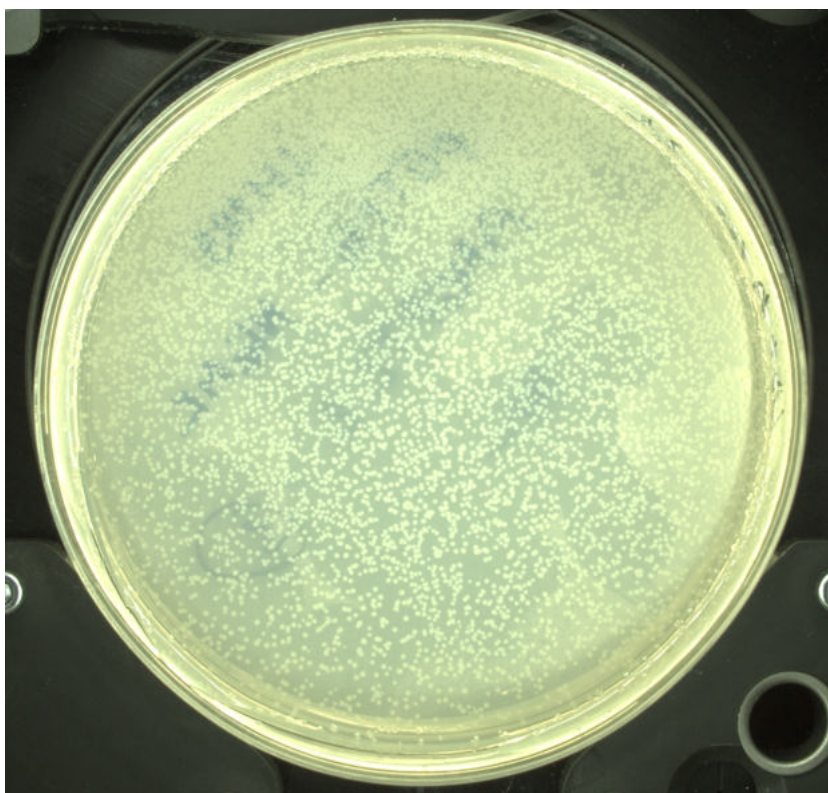
1.2.2 Kapalná média

Požadované mikroorganismy jsou suspendovány v kapalném živném médiu, jako je Luria Broth, ve svislé baňce. To umožňuje vědci vypěstovat velké množství mikroorganismů pro různé následné aplikace.[22]

1.2.3 Polotuhá média

Mikrobiální kultury lze pěstovat v Petriho miskách různých velikostí, které mají tenkou vrstvu růstového média na agaru. Jakmile je růstové médium v Petriho misce naočkováno požadovanými bakteriemi, jsou destičky inkubovány při optimální teplotě pro růst vybraných bakterií. Po dosažení požadované úrovně růstu mohou být agarové plotny uloženy obráceně v chladničce po delší dobu, aby se udržely bakterie pro budoucí experimenty.

Existuje celá řada přísad, které lze přidat do agarů, než se nechá se ztuhnout. v praxi je dostupných několik typů agarů, které mají různé barvy a jsou používány pro specifické stanovování různých požadovaných informací u konkrétních vzorků. Některé druhy mikroorganismů mohou růst pouze v přítomnosti určitých přísad. To lze také použít při vytváření geneticky upravených kmenů bakterií, které obsahují gen rezistence na antibiotika. Když se vybrané antibiotikum přidá na agar, budou moci růst pouze bakteriální buňky obsahující genovou vložku udělující rezistenci. [4] Obrázek 1.2 znázorňuje kultivaci bakteriální kolonie v polotuhém médiu v Petriho misce.



Obr. 1.2: Mikrobiální kultura v polotuhém médiu

1.3 Analýza mikrobiálních struktur

Analýza mikrobiálních struktur probíhá po úspěšné kultivaci kolonie. Pomocí různých metod jsou zjišťovány různé parametry jako je velikost kolonie, tvar, profil, barva. Následně může probíhat konkretizace mikroorganismu, pokud jde o neznámý vzorek. Testy jsou často prováděny odborným pracovníkem nebo se využívá přístrojové analýzy. [29][38]

1.3.1 Přímé metody

Přímé metody se zabývají hodnocením mikrobiální kolonie jako takové, bez odpovědi na vnější zásah.

Pozorovací analýza

Pozorovací analýza je nejjednodušší metodou zkoumání mikrobiálních struktur. Jedná se především o zkoumání velikosti, tvaru, barvy kolonií a případně zápachu. Je to subjektivní metoda závisající na testujícím jedinci. Odborný pracovník rozlišuje podle vizáže mikrobiální kolonie několik znaků [29], jako jsou například:

- velikost: může být malá (do 1mm), střední (2-3 mm) a velké (od 3mm),
- profil: může být plochý, zvýšený, vypouklý, pupkovitý nebo bradavčitý,
- tvar: může být okrouhlý, zvlněný, laločnatý nebo sektorový,
- okraje: mohou být vroubkované, s koncentrickou stavbou, svraštělé, vláknité, thizoidní, drsné nebo myceliální,
- barva a její struktura.

Biochemické metody

Biochemické metody zahrnují velké spektrum testů, které slouží k získání různých parametrů mikrobiální kolonie. Nejčastěji se používají k průkazu přítomnosti určitého mikroorganismu v daném vzorku.

Přístrojová analýza

Přístrojová analýza mikrobiálních kolonií se používá často při studiu buněčných kolonií. Nejprve je pořízen snímek kolonie a poté pomocí různých algoritmů lze klasifikovat kolonie na základě velikosti, tvaru nebo např. barvy.

Mezi metody využívající přístrojovou analýzu patří mimo jiné i hmotnostní spektrometrie. Tato výkonná analytická technika je využívána ke kvantifikaci známých materiálů, k identifikaci neznámých vzorků a k objasnění struktury nebo chemické struktury daných molekul. [10]

MALDI-MS Specifickým typem hmotnostní spektrometrie je technika MALDI-MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry). Je to hmotnostní spektrometrie s laserovou desorcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem. Metoda je aplikována, když je potřeba zjistit molekulovou hmotnost biologické molekuly, při monitorování biologických reakcí, při sekvenování peptidů a oligonukleotidů.

Principem MALDI-MS hmotnostní spektrometrie je detekování nabitých částic, které vznikají při měření v iontovém zdroji hmotnostního spektrometru při ionizaci. Poté jsou ionty rozděleny podle podílu své hmotnosti a náboje. Následně jsou ionty detekovány, čímž jsou získána hmotnostní spektra.

Bakteriální kultura je odebírána přímo z tekutého média nebo z agarové plotny a poté se mísí s roztokem rozpouštědla s vodou. Jako rozpouštědlo se často využívá acetonitril, který způsobí frakturu buňky a vypuštění proteinů. Princip přípravy vzorku spočívá ve smísení bakteriální suspenze, která je nanесena na kovovou destičku, ta je vysušena a umístěna do vakua v iontovém zdroji. Pulzy laseru zasáhnou krystaly ze zaschlé kapky a dojde k absorpci energie maticí, která absorbuje energii, rozkládá se na ionty a ionizuje vzorek za vysokého tlaku.

Výsledkem je pak charakteristický MALDI-MS profil proteinů a peptidů buňky. Výsledné spektrum podléhá zpracování, kde dochází ke specifikaci a kvantifikaci píků, výpočtu podobnosti mezi spektry a identifikaci vzorku v rámci rodu a druhu. Metoda je tedy vhodná pro identifikaci mikroorganismů i v klinické diagnostice. [24, 2]

1.3.2 Nepřímé metody

Principem nepřímých metod je odpověď organismu na přítomnost nějaké další dodané látky. Mezi nepřímé metody řadíme například imunochemické.

Imunochemické metody

Imunochemické metody využívají specifické vazby mezi protilátkou a příslušným antigenem. Díky této vazbě pak vzniká komplex protilátka-antigen. Pomocí těchto metod je tedy získána informace o přítomnosti patogenů nebo prokazujeme, jestli daný vzorek obsahuje protilátky vůči danému antigenu. [34]

Typickým příkladem imunochemické metody je enzymová imunoanalýza, která využívá enzymů ke značení antigenu či protilátky. Enzymová imunoanalýza je prováděna především dvěma technikami, jednou z nich je ELISA.

Metoda ELISA

Metoda ELISA (enzym-linked immuno sorbent assay) je technika sloužící ke stanovení množství antigenů ve vzorku. Je založena na reakci antigen-protilátka, kde je kovalentně navázán enzym katalyzující chemickou přeměnu substrátu na zabarvený produkt. Koncentrace se pak stanovuje spektrofotometricky nebo na základě fluorescence, tato koncentrace je přímo úměrná koncentraci antigenu ve vzorku. [16]

2 Metody segmentace

Segmentace obrazu je jedním ze základních kroků analýzy obrazu. Díky segmentaci získáme rozdělený obraz, kde se jednotlivé oblasti nepřekrývají. Každá oblast pak definuje určitou část ve scéně a souvisí s jejím věcným obsahem, který lze jednoduše poznat pomocí lidského oka. Výstupem segmentace je obraz se stejnou velikostí jako originál, jenž má vyznačené rozdělené oblasti. Díky tomu, že se hledají hranice, nebo určité objekty, ztrácí se část informace o obrazu.

Pro počítač je obtížné určení hranic objektů v obraze, zaměřuje se na změny v intenzitě barvy či změny odstínů. Problém je pak možné řešit dvěma přístupy. [11]

- Prvním přístupem je navrhnout algoritmus pro segmentaci konkrétního snímku. Tato metoda je výhodná v tom, že nepotřebujeme velké množství dat, na druhou stranu je potřeba pro každý problém vyvíjet nový algoritmus a potřebujeme tedy člověka, který ho bude pokaždé vytvářet.
- V druhém přístupu je principem získání dostatečného množství dat, ze kterých se počítač naučí problém řešit samostatně.

2.1 Klasické segmentační algoritmy

Segmentační metody jsou postaveny na různých principech, které slouží k rozdělení obrazu na oblasti, které mají smysluplný význam. Nejčastějším parametrem používaným pro segmentaci obrazu je jas. Datová matice může být však tvořena i jiným parametrem (např. entropie, vzájemná informace, rozptyl, atd.).

Metody segmentace lze dělit podle automatizace segmentace do dvou skupin

- poloaautomatické,
- automatické.

U poloaautomatické segmentace je potřebný odborník, který zajišťuje vstup pro správnou funkčnost algoritmu. Může to být nastavení prahové hodnoty nebo výběr počátečního bodu. Pokud lidský faktor selže, algoritmus bude mít špatný výsledek. Automatické segmentace nepotřebují vstup od uživatele a pracují samostatně.

Podle homogenity oblastí můžeme dělit segmentaci na:

- segmentace na základě parametrů obrazových pixelů,
- regionově orientovaná segmentace,
- hranově orientovaná segmentace.

2.1.1 Segmentace na základě parametrů obrazových pixelů

Prahování je nejjednodušší technika segmentace. Je založena na hodnocení jasu každého pixelu. s jedinou prahovou hodnotou transformuje obrázek ve stupních šedi

nebo barevný obraz na binární (černobílý) obraz. Binární mapa obsahuje dvě nespojité oblasti, jedna z nich obsahuje pixely s hodnotami vstupních dat menšími než prahová hodnota a další týkající se vstupních hodnot, které jsou na prahové hodnotě nebo nad ní. Prahování může probíhat za použití dvou prahů, kde je výsledkem šedotónový nebo binární obraz. Binární obraz bude výsledkem v případě, že jasová hodnota spadá mezi prahy, a druhou hodnotu když jasová hodnota spadá mimo interval. Šedotónový obraz pak vznikne v případě, že hodnoty z intervalu mezi prahy zůstanou zachovány a ostatní budou nulovány. [19]

2.1.2 Regionově orientovaná segmentace

Tyto techniky jsou, jak již bylo zmíněno, založeny na homogenitě prostředí, kterou je potřeba definovat na základě nějakého parametru. Tímto parametrem může být jasová hodnota, barva, textura, tvar, aj.

Mezi regionově orientované segmentace patří například segmentace s narůstáním oblastí. Principem této techniky je zvolení počátečního bodu, který se nazývá semínko, ze kterého se rozšiřuje segment. Semínka definují určitý segment vlastností, která je pro danou oblast typická. Vlastnost pixelu je dána parametrem (nejčastěji intenzita, lokální průměr nebo odchylka).

Dalším typem regionově orientované segmentace je metoda dělení a slučování oblastí. Principem metody je rozdělení obrazu na malé části, které jsou považovány za homogenní, porovnávání sousedních oblastí a jejich případné sloučení, pokud je splněno kritérium homogenity. [19]

2.1.3 Hranově orientovaná segmentace

Cílem hranově orientované segmentace je spojování hran do řetězců, které obklopují jednotlivé segmenty. Do této kategorie segmentačních metod můžeme zařadit Houghovu transformaci, kde se hledají v obraze objekty známých tvarů, které lze popsat rovnicí. Vstupním obrazem bývá hrubá hranová reprezentace a výstupním je pak částečně segmentovaný obraz. [19]

2.2 Segmentace s využitím strojového učení

Strojové učení pomáhá systému ke změně vnitřního prostředí tak, že bude zefektivněna jeho schopnost se přizpůsobit ke změnám okolního prostředí. Dochází tedy k procesu učení, kterým dosáhneme stavu sítě, kdy dokáže řešit situaci při předložení neznámých dat, na kterých předtím netrénovala. Segmentaci s využitím strojového učení můžeme dělit na dva typy učení: s učitelem a bez učitele. [5]

Segmentace s využitím strojového učení bez učitele

Tato metoda nemá k dispozici žádné výstupní hodnoty, není tedy schopna vůbec ověřovat své vlastní výstupy. Jejím základem jsou shlukovací algoritmy strojového učení jako je například k-means.

Říká se jim učení bez učitele, protože na rozdíl od supervizovaného učení neexistují správné odpovědi a neexistuje žádný učitel. Algoritmy se samy rozhodují o tom, jak vstup bude vypadat, velkou roli zde hraje podobnost jednotlivých ploch v obraze. [8]

Segmentace s využitím strojového učení s učitelem

Většina strojového učení využívá učení pod dohledem. v této metodě jsou převáděny vstupní proměnné (x) na výstupní proměnné (Y) pomocí funkce:

$$Y = f(X). \quad (2.1)$$

Cílem je aproximovat funkci tak dobře, že když jsou dodána nová vstupní data, je možné předpovědět výstupní proměnné pro neznámá data.

Říká se tomu učení s učitelem, jelikož proces algoritmu, který se učí z datové sady školení, lze považovat za učitele, který dohlíží na proces učení. Známe správné odpovědi, algoritmus iterativně předpovídá vstup na základě trénovacích dat a je opraven učitelem. Učení se zastaví, když algoritmus dosáhne přijatelné úrovně výkonu. Problémy s učením lze dále rozdělit na regresní a klasifikační problémy. Klasifikační rozumíme problém, kde je výstupní proměnnou kategorie. [8]

2.2.1 Hluboké učení

Všechny techniky strojového učení fungují tak, že získávají označené údaje o tréninku a na základě učení zpracovávají nové vstupy a přijímají rozhodnutí. Na rozdíl od toho hlubokého učení pracuje s neuronovými sítěmi a může dělat své vlastní závěry bez potřeby označených trénovacích dat. Neuronové sítě používají algoritmy, které jsou v síti přítomny vedle sebe a výstup jednoho neuronu podléhá výsledku jiného algoritmu. Tím se vytváří systém, který může při rozhodování napodobovat myšlení biologického mozku. Celé to pak tvoří model, který je dokonalým příkladem systému umělé inteligence. [27]

3 Konvoluční neuronové sítě

Neuronové sítě jako takové jsou známy především v živých organismech. Pro účely modelu byl vytvořen umělý neuron, kde vstupní hodnoty jsou reprezentovány množinou hodnot. Jednotlivé vstupní hodnoty jsou váhově ohodnoceny a po překonání prahu slouží jako vstup do aktivační funkce. Jednotlivé váhy modelují učení nebo uložení zkušeností z předchozích úkolů. Čím je váha u hodnoty vyšší, tím bude i vstup neuronu důležitější a preferovanější. Výstupní hodnota je pak dána aktivační funkcí po překonání prahu.[20]

První vrstva konvolučních neuronových sítí obvykle detekuje základní prvky, jako jsou vodorovné, svislé a úhlopříčné okraje. Výstup první vrstvy se přivádí jako vstup další vrstvy, která extrahuje složitější funkce, jako jsou rohy a kombinace hran. Při pohybu hlouběji do konvoluční neuronové sítě vrstvy detekují prvky na vyšší úrovni (např. objekty, tváře a další).

V případě propojení více neuronů vzniká neuronová síť, kde výstup jedné vrstvy neuronů je vstupem pro další vrstvu. Celé učení neuronových sítí záleží na nastavení vah a prahů jednotlivých neuronů. Výstupy závisí také na zvolení typu aktivační funkce. Konvoluční neuronová síť se obvykle skládá z několika vrstev konvoluce, ale obsahuje také další komponenty. Konečná vrstva konvoluční neuronové sítě je klasifikační vrstva, která bere výstup poslední konvoluční vrstvy jako vstup. Na základě aktivační funkce poslední konvoluční vrstvy vydává klasifikační vrstva skóre spolehlivosti (hodnoty mezi 0 a 1), které určují pravděpodobnost, že obrázek bude patřit do určité třídy. Přesnost výstupu se pak odvíjí od počtu trénovacích cyklů, které se nazývají epochy.

Konvoluční neuronové sítě jsou speciálním případem dopředné neuronové sítě a jsou v současnosti velmi využívány v hlubokém učení právě pro klasifikaci obrazu, segmentaci, apod. Skládají se z velkého množství navzájem propojených vrstev. Díky tomu je pak možná identifikace objektu v obrazu na základě podobnosti bez ohledu na posun, rotaci či deformaci.

Hlavní výhody konvolučních neuronových sítí spočívají v tom, že se jedná o samoúčící se a samoorganizované sítě bez nutnosti dohledu. Předzpracování navíc není v konvolučních neuronových sítích vyžadováno. Síť hlubokého učení dokáže automaticky rozpoznat složitější funkce z důvodu počtu konvolučních vrstev, které obsahuje. Tato funkce hlubokého učení podporuje schopnost sítě zpracovávat velká, vysoce dimenzionální data, která obsahují velké množství funkcí. [20] [21] [14]

3.1 Vrstvy konvolučních neuronových sítí

Konvoluční neuronové sítě se skládají z několika typických vrstev [13][20], kterými jsou:

- konvoluční vrstva,
- sdružovací (pooling) vrstva,
- plně propojená vrstva.

3.1.1 Konvoluční vrstva

Konvoluční vrstva je základním stavebním kamenem konvolučních neuronových sítí, kde dochází k většině výpočtů. Vyžaduje několik komponent, kterými jsou vstupní data, filtr a mapa příznaků.

Některé parametry konvoluční vrstvy, například váhy, se během tréninku upravují procesem zpětného šíření chyby a gradientního sestupu. Existují tři hyperparametry, které ovlivňují velikost výstupu a je nutné je nastavit před zahájením tréninku neuronové sítě. Prvním je nastavení počtu filtrů, což ovlivňuje hloubku výstupu (např. čtyři odlišné filtry přináší čtyři různé mapy příznaků, což vytváří hloubku čtyř). Druhým hyperparametrem je stride, což je vzdálenost nebo počet pixelů, kterými se jádro pohybuje po vstupní matici. Nastavení většího kroku pak přináší menší výstup. Další parametr, který se nastavuje před zahájením tréninku je hodnota zero-padding. Jednou z nevýhod konvolučního kroku je ztráta informací, které mohou existovat na okraji obrazu. Velmi jednoduchou, ale účinnou metodou k vyřešení problému je právě použití nulové výplně (zero-padding). Další výhodou nulové výplně je správa výstupní velikosti. Tím se nastaví všechny prvky, které spadají mimo vstupní matici na nulu, čímž se vytvoří se větší nebo stejně velký výstup.[13][20]

Konvoluce

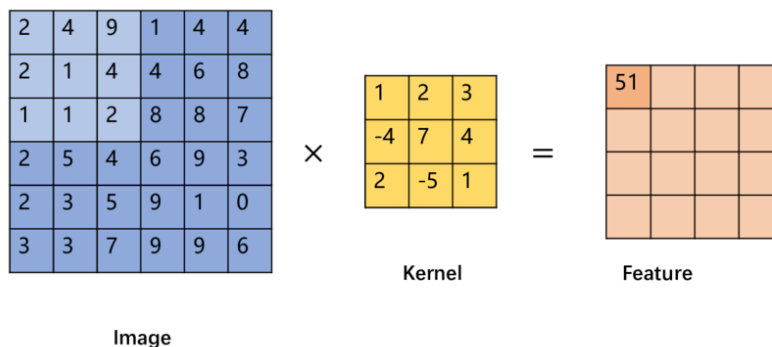
Při předpokladu, že vstupem bude barevný obrázek, který je tvořen maticí pixelů ve 3D, bude mít vstup tři rozměry - výšku, šířku a hloubku. Máme také detektor příznaků, známý také jako kernel. Kernel je dvourozměrná matice vah, jejíž velikost je obvykle 3x3. Tato velikost se může lišit, vždy však určuje velikost receptivního pole. Filtr se poté aplikuje na danou oblast obrazu a mezi vstupními pixely a filtrem se vypočítá bodový součin. Tento výpočet se poté převádí do výstupního pole. Následně se filtr posouvá krok za krokem po obrazu a proces se opakuje, dokud kernel neprojde celý obraz. Konečný výstup ze série výpočtů ze vstupu a filtru se nazývá mapa příznaků nebo aktivační mapa.

Konvoluce pro jeden pixel následující vrstvy je vypočítána podle následujícího vzorce:

$$\alpha(i, k) = (x * w)(i, k) = \sum_m \sum_n x(i - m, k - n)w(m, n), \quad (3.1)$$

kde (i,k) je jeden výstupní bod v aktivační mapě, x je vstupní obraz a w je kernel nebo filtr.

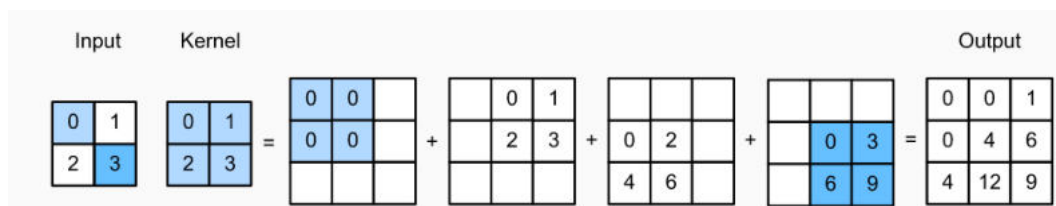
Princip konvoluce je graficky zobrazen na obrázku 3.1, kde probíhá konvoluce s jádrem o velikosti 3×3.



Obr. 3.1: Princip konvoluce[12]

Transponovaná konvoluce

Transponovaná konvoluce je metoda nadvzorkování, často chybně označovaná jako dekonvoluce, která používá konvoluční matici o specifické velikosti. Princip metody je takový, že se konvoluční jádro posouvá po vstupu, kde se vzorek po vzorku násobí se všemi hodnotami a při posunu klouzavého okna se překrývající hodnoty sečtou. Obrázek 3.2 graficky znázorňuje princip transponované konvoluce.



Obr. 3.2: Princip transponované konvoluce[30]

3.1.2 Pooling vrstva

Pooling vrstva provádí redukci rozměrů a snižuje počet parametrů na vstupu. Podobně jako u konvoluční vrstvy probíhá operace napříč celým vstupem, avšak bez použití vah.

Prostorové sdružování může být různých typů:

- maximální sdružování: filtr se pohybuje napříč vstupem, vybírá pixel s maximální hodnotou a odesílá ho do výstupního pole.
- průměrové sdružování: filtr pohybuje napříč vstupem, vypočítává průměrnou hodnotu a odeslání hodnotu do výstupního pole.

Nejčastěji se používá maximální sdružování, kde je vybrána nejvyšší hodnota v dané oblasti, která se ponechá a všechny ostatní jsou vyloučeny. I když se v pooling vrstvě ztratí mnoho informací, má pro konvoluční neuronové sítě řadu výhod, mezi které patří snížení složitosti, zvýšení efektivity a omezení rizika nadměrného vybavení.[13][20]

3.1.3 Plně propojená vrstva

Plně propojená vrstva je podobná způsobu, jakým jsou neurony uspořádány v tradiční neuronové síti. Každý uzel v plně propojené vrstvě je přímo připojen ke každému uzlu v předchozí i v další vrstvě. Plně propojená vrstva provádí klasifikaci na základě příznaků extrahovaných předchozími vrstvami a jejich různých filtrů. Zatímco konvoluční a pooling vrstvy používají často funkce ReLu, plně propojené vrstvy obvykle využívají aktivační funkci softmax ke vhodnému třídění vstupů, což vytváří výstupní pravděpodobnost zařazení k dané třídě od nula do jedné.[13][20]

3.2 Optimalizační metody

V rámci vypočítání chyby a jejímu zpětnému šíření je nutné modifikovat parametry sítě k čemuž se používají optimalizační algoritmy. Tyto algoritmy se snaží minimalizovat chybu (ideálně najít globální minimum chyby) a následně upravit parametry sítě na základě nalezené minimální hodnoty. Nejdříve je nutné vypočítat hodnotu gradientu, což je vektor parciální derivace chybové funkce podle vah. Díky hodnotě gradientu pak změni váhy v opačném směru gradientu.

Metoda gradientního sestupu je nejjednodušší optimalizační technika používaná v rámci strojového učení k trénování různých modelů. Učící proces se skládá z chybové funkce určující chybu, kterou má model strojového učení v dané datové sadě. Během tréninku jsou parametry tohoto algoritmu inicializovány na náhodné hodnoty. Při iteraci algoritmu se parametry aktualizují tak, abychom dosáhli blíže k optimální hodnotě funkce.

Adaptivních optimalizačních algoritmů existuje velké množství, tato práce se blíže věnuje algoritmům Adagrad a Adam, které jsou modifikacemi stochastického gradientního sestupu. Mezi další optimalizační algoritmy patří například Momentum, AdaMax, AMSGrad, Nadam, RMSprop a další.

Algoritmy adaptivní optimalizace si získávají popularitu díky své schopnosti rychle konvergovat. Všechny tyto algoritmy, na rozdíl od konvenčního gradientního sestupu, používají statistiky z předchozích iterací k zvýšení robustnosti procesu konvergence. [36]

3.2.1 Adagrad

Adagrad je algoritmus pro optimalizaci na základě gradientu, který přizpůsobuje rychlost učení parametrům a provádí menší aktualizace (tj. nízké rychlosti učení) pro parametry spojené s často se vyskytujícími příznaky a větší aktualizace (tj. vysoké rychlosti učení) pro parametry spojené s méně častými příznaky.

Jednou z hlavních výhod Adagradu je, že eliminuje potřebu manuální úpravy rychlosti učení. Většina implementací používá výchozí hodnotu 0,01, kterou tak ponechává. Metoda zajišťuje rychlejší konvergenci a únik z lokálních minim, což předchozí metoda nevyřešila.

Hlavní slabinou Adagradu je akumulace čtvercových gradientů ve jmenovateli, kde každá přidaná je kladná a akumulovaná suma během tréninku stále roste. To tedy způsobí, že se rychlost učení zmenší a nakonec bude nekonečně malá. V tomto okamžiku již algoritmus není schopen získat další znalosti.

Předpis metody Adagrad je:

$$\omega_i = \omega_{i-1} - g_i \frac{\alpha}{\sqrt{E[g^2]_i + \epsilon}}, \quad (3.2)$$

kde ω_i a ω_{i-1} jsou parametry vrstvy i , α je koeficient učení, ϵ je konstanta a g_i je gradient. [36]

3.2.2 Adam

Adaptive Moment Estimation (Adam) je další metoda, která počítá rychlosti adaptivního učení pro každý parametr. Kromě ukládání exponenciálně klesajícího průměru minulých čtvercových přechodů, jako tomu je u metod Adadelta a RMSprop, udržuje Adam také exponenciálně klesající průměr minulých přechodů, podobný hybnosti. Jedná se o nejrozšířenější optimalizační techniku.

Předpis metody Adam je:

$$\omega_i = \omega_{i-1} - m_i \frac{\alpha}{\sqrt{v_i + \epsilon}}, \quad (3.3)$$

kde ω_i a ω_{i-1} jsou parametry vrstvy i , α je koeficient učení, ϵ je konstanta, m_i je zanikající průměr předchozích gradientů a v_i je necentrováný rozptyl. Hodnoty v_i a m_i jsou na začátku nastaveny na 0. [36]

3.3 Regularizační metody

V obecném algoritmu učení je datová sada rozdělena na trénovací sadu a testovací sadu. Po každé epoše algoritmu jsou parametry odpovídajícím způsobem aktualizovány. Nakonec je tento trénovaný model aplikován na testovací sadu. V případě, že bude chyba trénovací sady menší ve srovnání s chybou testovací sady, pak došlo k nadměrnému vybavení sítě, kde si algoritmus zapamatuje trénovací data a vytvoří správné výsledky právě na trénovací sadě. Tento model se pak stává vysoce exkluzivní pro trénovací sadu a nedokáže poskytnout přesné výsledky pro další datové sady včetně testovací sady. Regularizační techniky se v těchto situacích používají ke snížení nadměrného vybavení a zvýšení výkonu modelu v jakékoli obecné datové sadě.

Regularizačních technik existuje několik, například L1 a L2 regularizace, augmentace dat nebo dřívější ukončení. Posledním dvou zmíněným technikám se práce blíže věnuje v následujících odstavcích.

3.3.1 Augmentace dat

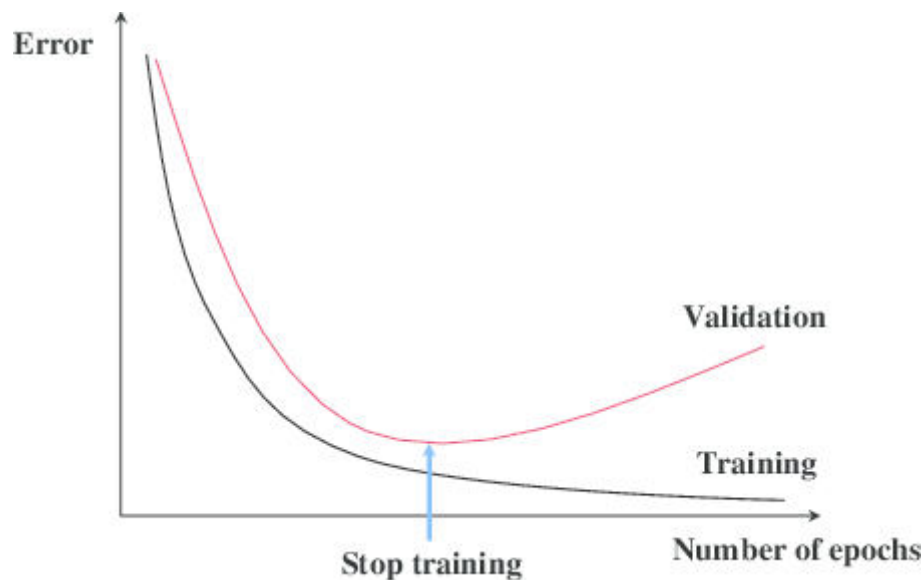
Augmentace dat je zásadní pro naučení sítě požadovaným vlastnostem invariance a robustnosti, když je k dispozici malé množství snímků. V případě mikroskopických obrazů potřebujeme primárně invariantnost posunu a rotace. Augmentace dat zahrnuje sadu technik, které zvyšují velikost a kvalitu trénovacích datových sad, takže je možné pomocí nich vytvářet lepší modely hlubokého učení. Augmentace dat trénovací množiny se provádí za předpokladu, že z původního souboru dat lze pomocí augmentací získat více informací. Tyto augmentace uměle zvětší velikost tréninkové datové sady. Tuto techniku lze provést několika různými způsoby. Je to například oříznutí, změna v barevném prostoru, převrácení snímku, přidání šumu, náhodné mazání, mixování obrázků nebo převzorkování. [40]

3.3.2 Dřívější ukončení

Dřívější ukončení je populární regularizační metodou díky své jednoduchosti a účinnosti. Regularizaci dřívějším ukončením lze provést rozdělením datové sady na trénovací a testovací množiny s následným použitím křížové validace na trénovací sadě. Je možné ji provést také rozdělením datové sady na trénovací, validační a testovací

množiny bez použití křížová validace. Při využití druhého způsobu bez křížové validace se algoritmus trénuje pomocí trénovací sady a bod, kde se trénování zastaví je určen pomocí validační množiny. Po každé proběhlé epoše se analyzuje chyba trénování a chyba validace. Trénovací chyba stále klesá, zatímco chyba validace klesá pouze do určitého bodu, kde se začne zvyšovat. Ke zvýšení chyby dojde z toho důvodu, že model během tréninku začne přeceňovat trénovací data, čímž způsobí, že se chyba tréninku sice sníží, ale se zvýší chyba validace. Model, který nebude přeučený lze tedy získat při použití parametrů, které poskytují minimální chybu na validační množině. Ve chvíli, kdy chyba validační sady začne stoupat, dojde k předčasnému ukončení. [7]

Obrázek 3.3 je grafickým znázorněním principu dřívějšího ukončení, kde je viditelné zastavení trénování při zvýšení původně klesající chyby na validační množině.



Obr. 3.3: Princip dřívějšího ukončení trénování modelu

[23]

3.4 Architektury konvolučních neuronových sítí

Architektur konvolučních neuronových sítí je dostupných velké množství, některé z nich jsou však v praxi často využívány. Tato kapitola se věnuje stručnému přehledu vybraných často používaných architektur a blíže se poté zaměřuje na architekturu využívanou později v praktické části práce.

3.4.1 AlexNet

AlexNet obsahuje 5 konvolučních vrstev a 2 plně propojené vrstvy, používá max-pooling po první, druhé a páté konvoluční vrstvě. Celkově obsahuje 650 tisíc neuronů, 60 milionů parametrů a 630 milionů připojení. AlexNet byl první, kdo ukázal, že hluboké učení je efektivní v úlohách počítačového vidění. Nevýhoda AlexNet je nadměrné vybavení, kterému lze předejít vhodnou augmentací dat a technikou dropout.[44]¹

3.4.2 VGGNet

VGGNet je konvoluční neurální síť, která může klasifikovat obrázky do 1000 kategorií objektů. Model trénoval na více než milionu obrázků z databáze Imagenet s přesností 92%. Vylepšuje AlexNet tím, že nahrazuje velké filtry (11 a 5 v první a druhé konvoluční vrstvě) za několik filtrů velikosti 3×3 za sebou.[15]

3.4.3 GoogLeNet

GoogLeNet je konvoluční neuronová síť skládající se z 22 vrstev, která je variantou Inception Network a byla vyvinuta vědci ze společnosti Google. Často se používá pro detekci a rozpoznávání tváří. [3]

3.4.4 ResNet

Síť byla vytvořena a seznámena společností Microsoft. s přesností 96,4% tento model zvítězil v soutěži ImageNet 2016. ResNet je známá díky své hloubce (do 152 vrstev) a zavedení reziduálních bloků. Jedním z problémů, které ResNets řeší, je známý problém mizejícího gradientu. Tento problém vzniká, když je síť příliš hluboká. s ResNets mohou gradienty procházet zpět z pozdějších vrstev do počátečních filtrů. [37]

3.4.5 ENet

ENet (Efficient Neural Network) dává schopnost provádět pixelovou sémantickou segmentaci v reálném čase. ENet je nejrychlejší model v sémantické segmentaci. [32]

¹Tato technika spočívá v „vypnutí“ neuronů s předem stanovenou pravděpodobností (např. 50%). To znamená, že každá iterace používá jiný vzorek parametrů modelu, což nutí každý neuron mít robustnější funkce, které lze použít s jinými náhodnými neurony. Vyřazení však také prodlužuje dobu učení potřebnou pro konvergenci modelu.

3.4.6 UNet

Na základě řešerše vhodných sítí pro zpracování biomedicínských obrazů bude v praktické části využíván model U-Net, který je zlatým standardem pro segmentaci biomedicínských dat. Sít dostala název podle její architektury, kde organizace vrstev vytváří písmeno U, což je viditelné na obrázku 3.4. UNet, který se vyvinul z tradiční konvoluční neuronové sítě, byl poprvé navržen a aplikován v roce 2015 ke zpracování biomedicínských obrazů. Obecná konvoluční neuronová síť se totiž zaměřuje na klasifikaci obrazu, kde vstup je obraz a výstup je jedna hodnota. Problém v biomedicínských případech je takový, že se vyžaduje, abychom nejen rozlišovali, zda existuje či neexistuje nemoc, ale také lokalizovali oblast abnormality. UNet se věnuje řešení tohoto problému. Důvodem, proč je schopen lokalizovat a rozlišit hranice, je klasifikace na každém pixelu, takže vstup a výstup mají stejnou velikost. Díky tomuto má síť UNet vysokou rychlost oproti ostatním dostupným архитектурám. Její další výhodou je to, že není potřebná velká množina vstupních dat jako u jiných typů sítí.

Architektura sítě

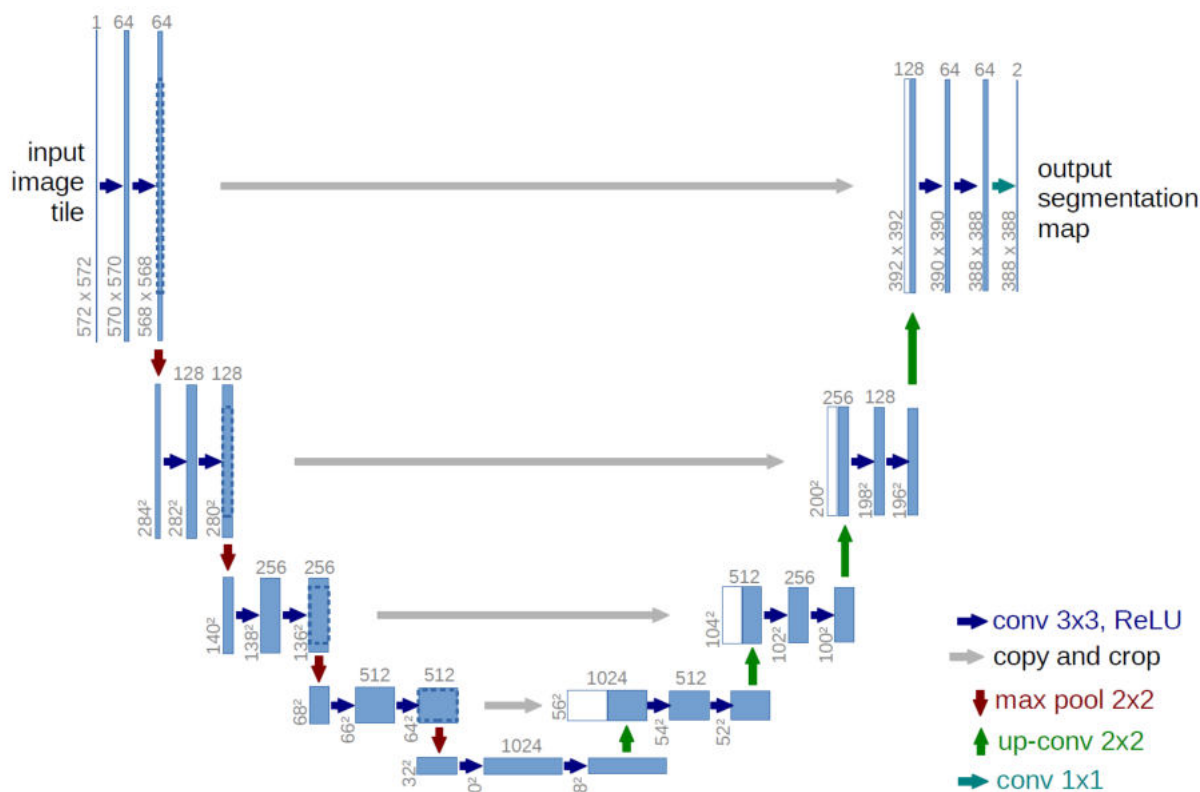
Architektura sítě U-Net je znázorněna na následujícím obrázku:

Architekturu lze rozdělit na dvě strany (pravou a levou). Na levé straně se data smršťují a na pravé expandují. Kontrakční strana má typickou architekturu konvoluční sítě. Skládá se z opakované aplikace dvou konvolucí s jádrem o velikosti 3×3 s následnou ReLU vrstvou. Následuje vrstva sdružování o s funkcí max, velikosti 2×2 a krokem 2 pro podvzorkování. v každém kroku převzorkování se dvakrát zvětšuje počet příznaků. Obraz byl převzorkován na velikost $28 \times 28 \times 1024$.

Expanzivní strana začíná převzorkování mapy prvků následovanou konvolucí s velikostí jádra 2×2 („up-convolution“), která snižuje počet kanálů funkcí na polovinu. Následují dvě konvoluce s velikostí kernelu 3×3 , každá následovaná ReLU vrstvou. Nyní je dosaženo nejvyšší úrovně architektury, posledním krokem je změna tvaru obrazu tak, aby vyhovoval předpovědním požadavkům. v závěrečné vrstvě je ještě provedena konvoluce s velikostí kernelu 1×1 pro mapování každého vektoru funkcí na požadovaný počet tříd. Sít má celkem 23 konvolučních vrstev.[35]

Trénování sítě

K trénování sítě se používají vstupní obrazy a jejich odpovídající segmentační mapy. Výstupní obraz je v naší verzi modelu stejně velký jako vstupní. Pro maximální využití paměti GPU jsou upřednostňovány velké vstupní matice před velkým počtem obrázků.



Obr. 3.4: Architektura sítě U-Net

[35]

Předem je vypočítána váhová mapa pro každou segmentaci, aby se tím kompenzovala různá frekvence pixelů z určité třídy v datové sadě tréninku a tím je síť donucena k naučení malých hranic oddělování.

V konvolučních neuronových sítích s mnoha konvolučními vrstvami a různými cestami po síti je velmi důležitá vhodná inicializace vah. Pokud je nevhodná inicializace vah, mohou části sítě poskytovat nadměrné aktivace, zatímco jiné části nemusí vůbec přispívat. v ideálním případě by počáteční váhy měly být upraveny tak, aby každá mapa prvků v síti měla přibližně jednotkovou odchylku. Pro síť s architekturou U-Net toho lze dosáhnout zavedením počátečních vah z Gaussova rozdělení se střední kvadratickou odchylkou.[35]

3.5 Segmentace obrazů Petriho misek

Dříve byly pro segmentaci používány výše uvedené klasické segmentační přístupy v kombinaci s pokročilou statistickou analýzou, které úspěšně segmentovaly lékařské snímky. Novější výzkum však zdůrazňuje rychlost zpracování a přesnost výsledků získaných pomocí strojového učení.

3.5.1 Segmentace pomocí hlubokého učení

Hluboké učení, které obecně využívá vícevrstvé modely konvolučních sítí rozšiřuje další techniky strojového učení využíváním komplexních spojení mezi naučenými parametry a přidáním nelineárních aktivačních funkcí, aby bylo možné dosáhnout aproximace téměř jakéhokoli typu funkce.

Často jsou také využívány konvoluční neuronové sítě pro segmentaci a klasifikaci obrazu, jelikož mají vysoce dimenzionální naučená jádra, které aplikují na seskupené obrazové pixely. Konvoluční neuronové sítě poskytují výhodu v tom, že jejich naučené funkce jsou prostorově invariantní, což znamená, že obrazové prvky lze rozpoznat bez ohledu na jejich pozici v obraze. Díky tomu jsou takové modely užitečné pro zpracování obrázků s více podobnými funkcemi a robustní proti změnám polohy nebo zobrazovacích podmínek. [17]

3.5.2 Výhody segmentace pomocí hlubokého učení

Výhody vyšší přesnosti v mikrobiologické analýze prováděné počítačem jsou nepochybně důležité. Ve zdravotnictví to znamená kratší dobu očekávání výsledků testů a správnější diagnózy založené na přesnějších výsledcích testů, což je zásadní pro pacienty. Pro podniky zabývající se mikrobiologickou analýzou (obvykle ve velkém objemu) by to bylo významné řešení pro snížení času a nákladů.[18]

3.5.3 Nevýhody segmentace pomocí hlubokého učení

Na druhou stranu existuje i několik nevýhod při používání algoritmů hlubokého učení při segmentaci biomedicínských obrazů Petriho misek. Zatímco snadná implementace pomocí běžných programovacích nástrojů umožňuje rozšíření metod na nové aplikace i bez odborníků, tak složitost a stále se rozvíjející základní porozumění hlubokému učení může vést k nesprávné interpretaci výsledků a špatné reprodukovatelnosti. Kromě toho mohou být modely náchylné k nadměrnému vybavení, což může zůstat bez povšimnutí bez pečlivé analýzy chyb. Model, který přesně označuje data na kterých je přeučený, tak pravděpodobně selže, když se zpracuje nová data, protože jeho komplexní funkce nepopisuje skutečnou variaci v datech. Nadměrně vybavený model proto není pro práci užitečný. [17]

4 Návrh metodiky experimentů a hodnocení

Společnost Bruker, s.r.o. vyvíjí přístroj s názvem MBT Pathfinder, jehož úkolem je automatizace procesu transferu bakteriálních kolonií na MALDI destičky.

Prvním krokem v procesu je vkládání misky a vybírání kolonie, která bude přemístěna. Tento krok lze provést manuálně na obrazovce nebo nechat vybrat kolonie algoritmem, který slouží k zpracování a segmentaci obrazu dané misky. Algoritmus je naučený pomocí trénovací množiny, která obsahovala omezený počet známých dat. Cílem této práce je, mimo jiné, zjistit, jaké množství dat je potřeba pro natrénování modelu, když se vyskytne úplně nový motiv kolonie, aby byl algoritmus schopný poskytnout dobrý výsledek.

4.1 Datová sada

Data, která budou používána k trénování modelu jsou z datové sady o velikosti 1525 snímků, kterým byla připravena i segmentační maska. Původní snímky byly barevné a měly rozlišení 1900×1800 pixelů. Snímky byly získány při testování, verifikaci a validaci již zmíněného přístroje MBT Pathfinder společnosti Bruker, s.r.o. Obrázek 4.1 je originální snímek z datasetu (vlevo) a jeho vytvořená segmentační maska (vpravo).



Obr. 4.1: Snímek z datasetu a jeho maska

Tyto masky byly vytvořeny ručně v programu Masker. Každý snímek byl otevřen v programu a za pomoci funkcí jako je kouzelná hůlka, případně díky volnému kreslení byly označeny buněčné kolonie, čímž byl získán černobílý obraz. Celý tento proces vytváření masek je časově velmi náročný, nicméně zatím není lepší, přesnější ani rychlejší způsob, který by ho nahradil.

4.2 Vliv parametrů na trénování modelů strojového učení

Parametrů, které mohou mít vliv na trénování modelů strojového učení je hned několik. Vychází-li se z používaného datasetu, je jedním z parametrů určitě barva agaru, který je na snímku. Agar má specifickou barvu podle toho, co je to za typ a jaké složky se v něm nachází. Data pak obsahují různorodé barvy agaru, ve kterých byly kultivovány buněčné kolonie. Pokud se jedná o barvu, bude záležet i na jejím odstínu. Podle tohoto znaku lze totiž určit i stáří vzorku. Čím méně sytý je odstín barvy, tím starší pak vzorek je.

Dalším parametrem, který se týká přímo vizáže snímku je okolí vzorku. s tímto souvisí i osvětlení misky, která může dodat stejnému vzorku jinou vizáž při pořizování jeho snímku. Buněčné kolonie v Petriho miskách jsou snímány dohromady i s částí okolí (snímky jsou obdélníkové, zatímco Petriho miska je kruhová nádoba). Nicméně tento parametr by neměl ovlivnit trénování modelu, jelikož toto prostředí je neměnné a okolí všech snímků je tedy identické.

Celková vizáž buněčné kolonie je dalším z parametrů, který bude mít pravděpodobně nějaký vliv na trénování. v datasetu je několik typů kolonií, které se od sebe výrazně liší tvarem, bude tedy při trénování záležet, jaký tvar zrovna kolonie má a je možné, že natrénování modelu na jeden typ kolonie bude složitější/jednodušší, než na jiný tvar kolonie.

Dalším parametrem, který se netýká vizáže datasetu, je velikost trénovací množiny. Pokud bude velikost datasetu příliš malá, může dojít k přeučení nebo k nedostatečnému naučení. Augmentace dat je zásadní pro naučení sítě požadovaným vlastnostem invariance a robustnosti, když je k dispozici malé množství snímků. v případě mikroskopických obrazů potřebujeme primárně invariantnost posunu a rotace. Augmentace dat zahrnuje sadu technik, které zvyšují velikost a kvalitu trénovacích datových sad, takže je možné pomocí nich vytvářet lepší modely hlubokého učení. [40]

4.3 Model síť UNet

Na základě rešerše vhodných sítí pro zpracování biomedicínských obrazů byl vybrán model U-Net. Tento model je zlatým standardem pro segmentaci biomedicínských dat. Používaný model je standardním typem sítě UNet, obsahuje čtyři bloky enkodéru a 4 bloky dekodéru. Dochází k trénování 100 epoch s použitím předčasného ukončení (tzv. early stopping), kde je v případě, že se F1 skóre nezlepší v 10 po sobě jdoucích epochách, trénování předčasně ukončeno. Je použit optimalizační metoda

Adam, což je adaptivní metoda rychlosti učení. Počítá individuální míru učení pro různé parametry. [9] Vstupem modelu je obraz o velikosti 512×512 a výstupem obraz o stejné velikosti.

4.4 Metriky pro vyhodnocení výsledků modelů hlubokého učení

K vyhodnocení výsledků modelů hlubokého učení se nejčastěji používají následující metriky: pozitivní prediktivní hodnota, přesnost, senzitivita, F1 skóre a chyba klasifikace, které jsou popsány v následujících podkapitolách. [31] Hodnoty jednotlivých modelů a závislostí pak byly porovnány a pro grafickou názornost vyneseny do grafů.

Pozitivní prediktivní hodnota

V segmentaci a klasifikaci informací je pozitivní prediktivní hodnota (PPV-positive predicted value) definována vzorcem:

$$PPV = \frac{TP}{TP + FP}, \quad (4.1)$$

kde TP znamená true positive (počet skutečně pozitivních) a FP znamená false positive (počet falešně pozitivních). TP jsou správně identifikované kolonie, které se v obrázku nacházejí a algoritmus je správně identifikoval. FP jsou naopak místa, kde algoritmus identifikoval kolonii, která se tam nenachází (může to být například odlesk). Pozitivní prediktivní hodnota říká, jak přesný je model. Dává informaci o tom, kolik je skutečně pozitivních z předpovězených pozitivních. Pozitivní prediktivní hodnota je dobrým měřítkem k určení, kdy jsou data na falešné pozitivní výsledky náchylná. [39]

Přesnost

Accuracy (ACC) je stejně jako jiná používaná metrika Precision překládána do českého jazyka jako přesnost. v této práci je používáno českého slova přesnost pro accuracy a precision je překládáno jako pozitivně prediktivní hodnota. Při měření sady je přesnost (ACC) blízkostí měření ke konkrétní hodnotě, zatímco pozitivně prediktivní hodnota (precision, PPV) je vzájemná blízkost měření.

Přesnost je definována vzorcem:

$$ACC = \frac{TP + TN}{TP + FP + FN + FP}, \quad (4.2)$$

kde TP je true positive (počet skutečně pozitivních), TN je true negative (počet skutečně negativních), FN je false negative (počet falešně negativních a FP je true

negative (počet falešně pozitivních). To znamená, že přesnost je podíl správných předpovědí (skutečných pozitiv i skutečných negativů) z celkového počtu zkoumaných případů.

Přesnost vyjadřuje popis systematických chyb, míru statistického zkreslení. Nízká přesnost způsobí rozdíl mezi výsledkem a „skutečnou“ hodnotou. Jinak je možné nazvat přesnost pravdivostí. [41]

Senzitivita

Senzitivita je definována vzorcem:

$$TPR = \frac{TP}{TP + FN}, \quad (4.3)$$

kde TP znamená true positive (počet skutečně pozitivních) a FN znamená false negative (počet falešně negativních). TP jsou kolonie, které algoritmus správně identifikoval- skutečně se na daném místě nacházejí. FN jsou místa, kde algoritmus správně neoznačil žádné objekty, protože se na zde nenacházejí. Senzitivita testu, neboli citlivost testu, nabývá hodnot od 0 do 1 (případně 0-100 v procentech) a vyjadřuje úspěšnost, s níž algoritmus zachytí přítomnost sledovaného objektu u daného snímku. [39]

F1 skóre

Ve statistické analýze klasifikace je F-skóre měřítkem přesnosti testu. Vypočítává se z pozitivní prediktivní hodnoty a senzitivity podle následujícího vzorce:

$$F1 = 2 * \frac{PPV * TPR}{PPV + TPR}, \quad (4.4)$$

kde pozitivní prediktivní hodnota (PPV) je počet správně identifikovaných pozitivních výsledků děleno počtem všech pozitivních výsledků, včetně těch, které nebyly správně identifikovány, a senzitivita je počet správně identifikovaných pozitivních výsledků dělený počtem všech vzorků, které měly být identifikovány jako pozitivní. Skóre F1 je pak harmonický průměr pozitivní prediktivní hodnoty a senzitivity. Nejvyšší nožná hodnota F-skóre je 1, což označuje perfektní přesnost a senzitivitu, naopak nejnižší je 0, což znamená, že přesnost nebo senzitivita je nulová. [39]

4.5 Formulace experimentů

Na základě předchozí kapitoly, bylo vybráno pět experimentů testujících vliv trénovací množiny na úspěšnost modelu na testovací množině, které budou postupně popsány, otestovány a zhodnoceny.

Experimenty, které budou postupně provedeny, jsou následující:

Vliv velikosti trénovací množiny na přesnost algoritmu

Trénovací množina obsahuje mnoho snímků. Experiment bude sledovat přesnost modelu při použití různé velikosti trénovací množiny a jeho cílem je zjistit, jaké množství snímků je nutné použít pro co dostatečnou přesnost segmentace. Vliv barvy agarů na přesnost algoritmu Kolonie se běžně nanáší na různé typy agarů podle potřeby daných mikroorganismů a záměrem jejich kultivace. Typy agarů se od sebe liší svou barvou, která se pak může ještě měnit podle délky uchovávání vzorku nebo po reakci s mikroorganismem. Po snímání těchto misek vzniklo v datové sadě několik kategorií podle barvy agarů, z těchto byly vybrány ty nejvýraznější a nejčastěji zastoupené (bílá, červená). Experiment bude testovat jaký má vliv barva agarů na přesnost algoritmu.

Vliv tvaru kolonie na přesnost algoritmu

Datová sada obsahuje velké množství snímků různých kolonií, které se od sebe liší tvarem. Cílem tohoto experimentu je zjistit, jaký má vliv tvar kolonie na přesnost algoritmu, zda bude model lépe segmentovat některé tvary, nebo bude jeho přesnost podobná.

Vliv okolí misky na přesnost algoritmu

Petriho misky jsou kulatého tvaru, je tedy jasné, že pořízený snímek, který je obdélníkový, bude obsahovat za okraji okrouhlé misky nějaké množství pozadí. Přestože jsou misky snímány na nehomogenním pozadí, toto pozadí je neměnné. To znamená, že každá miska ho má stejné. Experiment bude sledovat, zda bude mít vliv, pokud se použijí celé snímky i s originálním pozadím nebo když se zabarví pozadí misek do černa a tyto snímky se následně použijí se pro trénování modelu.

Vliv rozdělení datové sady při trénování modelu na přesnost algoritmu

Datová sada je vždy poměrově rozdělena do tří kategorií: snímky pro trénování, validaci a testování. Tento experiment sleduje, zda bude mít vliv na přesnost modelu různé rozdělení datové sady do těchto tří skupin.

5 Experimentální část

Experimentální část práce se věnuje jednotlivým experimentům: jejich podrobnějšímu popisu, metodice hodnocení, testování a výsledkům.

5.1 Experiment 1: Vliv velikosti trénovací množiny

Kompletní trénovací množina obsahuje stovky snímků. Experiment bude sledovat přesnost modelu při použití různé velikosti trénovací množiny a jeho cílem je zjistit, jaké množství snímků je nutné použít pro co dostatečnou přesnost segmentace.

5.1.1 Návrh experimentu

Příprava dat

Obsáhlá datová sada obsahuje 1525 obrazů, které byly získány při testování, verifikaci a validaci již zmíněného přístroje MBT Pathfinder společnosti Bruker, s.r.o. Snímky lze kategorizovat do několika skupin podle tvaru kolonizační plochy, dále podle způsobu osvětlení misky a dle použitého typu agaru. Pro tento experiment bylo vybráno 282 snímků, které si byly typově podobné- snímky obsahují jeden typ tvaru kolonií a jeden způsob osvětlení. Používají se snímky z jedné kategorie kvůli eliminaci vlivu jiných parametrů datové sady.

V prvním kroku experimentu byla u každého snímku vysegmentována kolonie, čímž vznikla binární maska obrazu. Tyto masky byly vytvořeny manuálně v programu Masker za pomoci funkcí jako je kouzelná hůlka, případně pomocí volného kreslení, byly označeny buněčné kolonie, čímž byla získána binární maska.

Předzpracování dat

Původní velikost snímku byla 1900×1800 pixelů. Následné trénování probíhalo na grafické kartě Nvidia GTX 1080Ti, vstupní obrázky měly velikost 512×512 pixelů. Aby nedošlo ke ztrátě informace, původní snímky byly rozděleny pomocí vytvořeného skriptu psaného v programovacím jazyku Python na šestnáct čtvercových nepřekrývajících se oblastí o velikosti 512×512 . Tímto způsobem byla vytvořena datová sada, používaná pro trénování modelu tohoto experimentu o celkové velikosti 4496 snímků.

Průběh experimentu

Z vytvořené datové sady vybralo v prvním kroku pouze 10 % snímků, které se použily pro jeho trénování, validaci a testování. Po získání výsledků z této části

experimentu byla datová sada navýšena o dalších 10 % a proběhlo natrénování úplně nového modelu s větším datasetem. Tento proces byl opakován až do vyčerpání všech snímků určených pro tento experiment. Proběhlo tedy celkem 10 trénování 10 různých modelů. Výsledky přesnosti segmentace jednotlivých modelů pak byly zpracovány pro vyhodnocení výsledků prvního experimentu.

Trénování modelu

Samotné trénování modelů pak probíhalo v již dostupném programu, který je napsaný v programovacím jazyku Python. Pro práci s modelem hlubokého učení byl použit framework Keras s backendem TensorFlow. Byla použita architektura U-Net, která je popsána výše v práci. Při trénování modelu nebyla použita augmentace dat, každý snímek byl pouze normalizován do hodnot 0 až 1. Krok učení byla nastaven na 0,0001 a jako optimalizační metoda byla použita metoda Adam.

Při trénování modelu byla použita kromě trénovací množiny i validační množina, která sloužila k tomu, aby se zjistilo, zda nedošlo k přetrénování modelu na snímcích z trénovací množiny. Datová sada byla vždy před samotným trénováním náhodně rozdělena na trénovací (70 %), testovací (10 %) a validační (20 %). Po proběhnutí jedné epochy byl model vždy otestován na validační množině, kde se ověřovala jeho přesnost. Celkový počet epoch byl nastaven na hodnotu 100 s tím, že bylo možné dřívejší ukončení, v případě, že nedochází již 10 epoch k zlepšování učení.

5.1.2 Metodika hodnocení

Hodnocení prvního experimentu probíhá především na základě F1 skóre, které je zásadní při určování přesnosti segmentace modelu. Další sledovaná hodnota je přesnost, což je míra všech správně identifikovaných případů. Bližší definice těchto pojmů a rovnice pro jejich vypočítání jsou uvedeny v podkapitole 4.4 Metriky pro vyhodnocení výsledků modelů hlubokého učení.

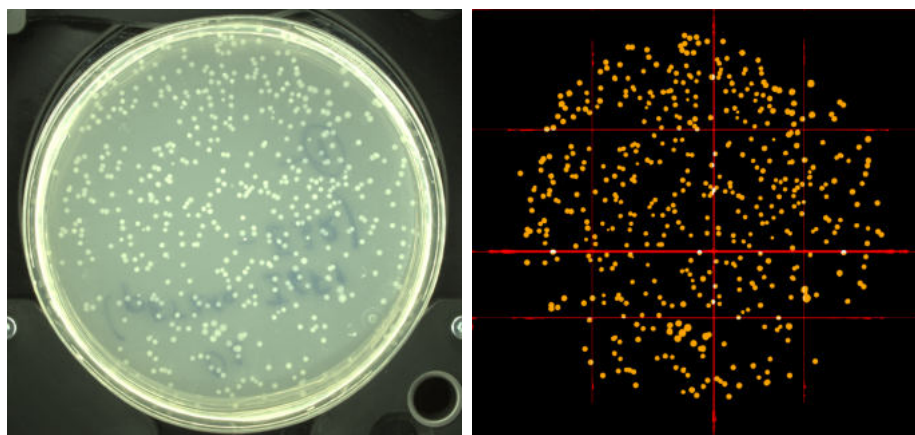
V rámci tohoto experimentu byla stanovena, pro definování natrénovaného modelu jako dostatečně přesného v segmentaci, hraniční hodnota F1 skóre 0,5. Na základě této hodnoty budou tedy rozděleny modely na úspěšné a neúspěšné, čímž bude stanovena minimální velikost datové sady potřebná pro dostatečně kvalitní segmentaci obrazu v tomto experimentu.

5.1.3 Výsledky experimentu

Použití 10 % datové sady

První model využíval pouze 10 % z datové sady, konkrétně jen 449 snímků. Výsledky se očekávaně ani neblížily definici úspěšného modelu. I když jeho přesnost byla 0,956,

tak senzitivita byla pouze 0,0678. To znamená, že model velmi špatně identifikoval pozitivní hodnoty ze všech skutečně pozitivních případů a výsledky čítaly velké množství falešně negativních hodnot. F1 skóre bylo také velmi nízké, konkrétně 0,027. Segmentaci obrazu pomocí tohoto netrénovaného modelu názorně ukazují následující obrázky, kde levý obraz je originální snímek a vpravo je segmentovaný obraz. Bílá barva jsou správně detekované kolonie a černá jsou naopak správně nenalezené kolonie. Červená barva znamená chybně pozitivní výsledek. To znamená, že algoritmus označil za hledaný segment místo, které reálně není buněčnou kolonií. V případě, že se vyskytuje ve snímku výsledku oranžová barva, jsou to místa, která algoritmus neoznačil, i když se právě na tom místě nachází hledaný segment.



Obr. 5.1: Segmentace obrazu při použití 10 % datové sady experimentu

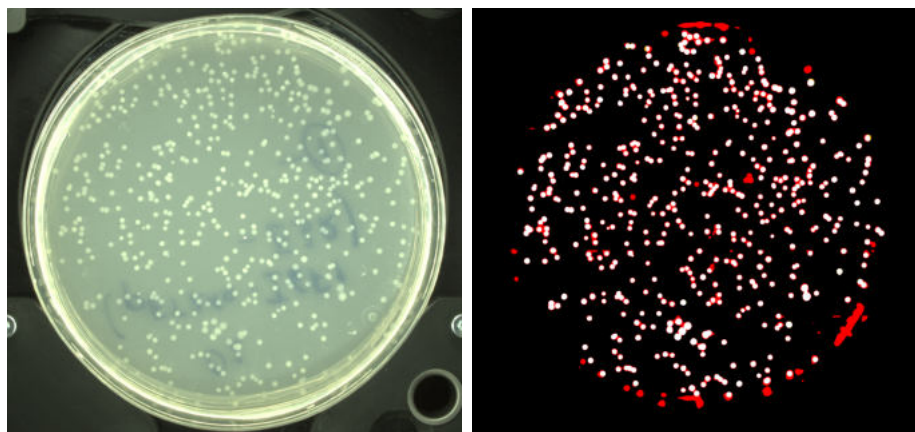
Použití 100 % datové sady

Poslední a nejlepší model využíval pro trénování, validaci a testování celou datovou sadu experimentu, tedy 4496 snímků. Přesnost tohoto modelu je 0,939 a senzitivita 0,752. Hodnota F1 skóre je 0,630. Dosáhl tedy očekávaně nejlepších výsledků ze všech natrénovaných modelů a lze jej prohlásit za úspěšný, jelikož segmentuje obraz dostatečně dle kritérií tohoto experimentu.

Nejlepší segmentaci obrazu tohoto experimentu lze pozorovat na následujících obrázcích. Vlevo se nachází originální snímek buněčných kolonií a vpravo je pak grafický výstup modelu. Bílé tečky jsou správně detekované segmenty a oranžová barva ukazuje na místa, kde ještě měly být nalezeny. Černá barva znázorňuje správně nedetekované kolonie a červená pak chybně nalezené segmenty, které tam nejsou.

Úspěšnost experimentu

Přesnost modelu byla vysoká již v první části experimentu při použití pouhých 10 % snímků. Je vysoká kvůli tomu, že i když model nedetekuje správně téměř žádné



Obr. 5.2: Segmentace obrazu při použití celé datové sady experimentu

% snímků z datové sady	F1 skóre	Přesnost	Senzitivita
10	0,027	0,956	0,067
20	0,106	0,814	0,814
30	0,315	0,915	0,778
40	0,414	0,940	0,773
50	0,420	0,936	0,728
60	0,475	0,937	0,755
70	0,495	0,941	0,748
80	0,512	0,924	0,729
90	0,588	0,926	0,730
100	0,630	0,939	0,752

Tab. 5.1: Výsledky experimentu č.1

správně pozitivní hodnoty, segmentuje dobře správně negativní hodnoty. Tímto je pak ze samotného vzorce přesnosti získáno vysoké číslo. Je tedy vhodnější se řídit podle F1 skóre, které lépe vypovídá o přesnosti experimentu. Všechny hodnoty přesnosti jednotlivých modelů jsou uvedeny v tabulce 5.1.

Senzitivita při přidávání snímků nemá ryze lineární vzestup, lze pozorovat spíše kolísavý průběh při přidávání snímků do datové sady. Pokud má model nižší senzitivitu znamená to, že detekoval více falešně negativních hodnot. Tento jev je různý při různém počtu snímků v datové sadě, takže nelze pozorovat linearitu při jejich přidávání.

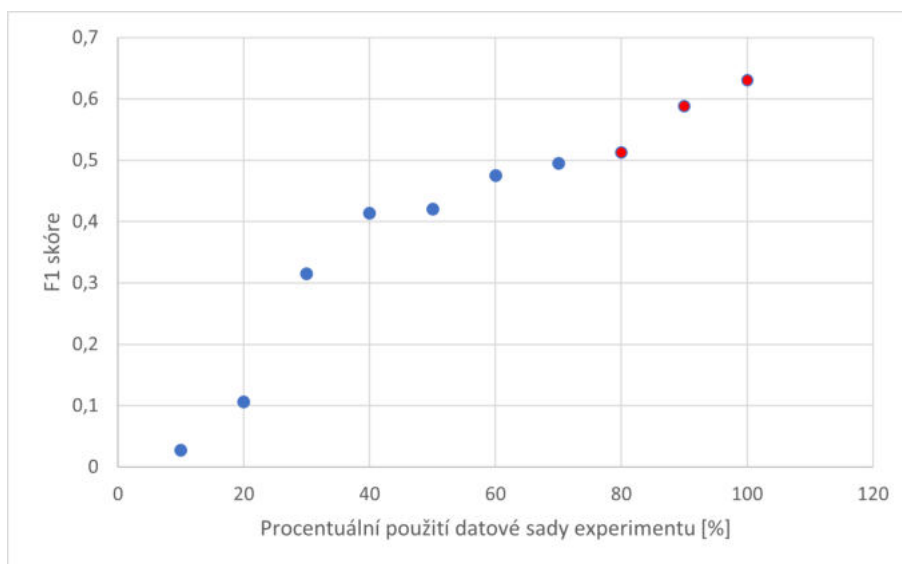
V průběhu zvětšování datové sady pro trénování modelů docházelo u každého přidání ke zlepšování přesnosti modelu. Tabulka 5.1 ukazuje, že F1 skóre se zvyšovalo při každém vložení dalších snímků do datové sady.

Hranice úspěšnosti modelu byla stanovena tak, že hodnota F1 skóre musí být

rovna nebo vyšší než číslo 0,5. Sedmý model se dostal těsně pod hranici definované úspěšnosti, kde jeho F1 skóre bylo 0,495. Při přidání dalších deseti procent snímků bylo dosaženo opětovnému zlepšení segmentace obrazu. Díky tomu, že F1 skóre dosáhlo hodnoty 0,512, lze tento model považovat za úspěšný. Osmý model požíval celkem 3598 snímků a toto množství je tedy dostatečné pro trénování, validaci a testování modelu, který bude segmentovat obraz s dostatečnou přesností, jejíž hranice byla stanovena v předchozí kapitole.

Experiment mohl být v tuto chvíli zastaven, jelikož bylo dosaženo dostatečné úspěšnosti stanovené při návrhu experimentu, nicméně v něm bylo pokračováno pro zjištění výsledků při použití celé datové sady.

Hodnoty F1 skóre jednotlivých částí experimentu byla zpracovány do grafu 5.3 s vyznačením úspěšného (červeně) a neúspěšného (modře) modelu.



Obr. 5.3: Hodnoty F1 skóre modelů prvního experimentu

5.1.4 Závěr

První experiment vykazuje, že pro naučení úspěšného modelu je nutné mít dostupných alespoň 3598 snímků. Úspěšné modely tohoto experimentu byly ty, které používaly pro trénování, validaci a testování 80 %, 90 % a 100 %. Pro model, který bude mít výslednou hodnotu F1 skóre vyšší, než je 0,6, je nezbytné použít pro trénování, validaci a testování alespoň 4496 snímků. Experiment by bylo vhodné zopakovat s použitím větší celkové datové sady a tím zjistit, zda je možné dosáhnout ještě vyšší přesnosti segmentace, než které bylo dosaženo v rámci této práce.

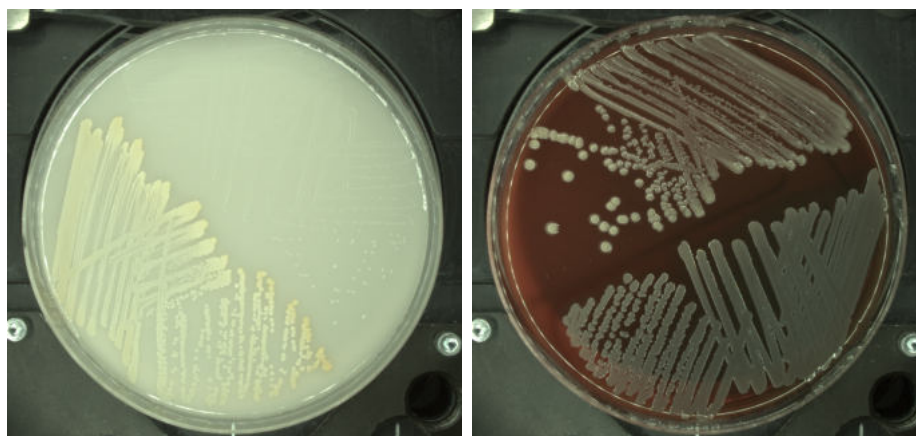
5.2 Experiment 2: Vliv barvy agaru

Kolonie se běžně nanášejí na různé typy agaru podle potřeby daných mikroorganismů a záměrem jejich kultivace. Typy agaru se od sebe liší svou barvou, která se pak může ještě měnit podle délky uchovávání vzorku nebo po reakci s mikroorganismem. Po snímání těchto misek vzniklo v datové sadě několik kategorií podle barvy agaru, z těchto byly vybrány ty nejvýraznější a nejčastěji zastoupené (bílá, červená). Experiment bude testovat jaký má vliv barva agaru přesnost algoritmu.

5.2.1 Návrh experimentu

Příprava dat

Datová sada snímků obsahuje 1525 obrazů získaných při testování, verifikaci a validaci již zmíněného přístroje MBT Pathfinder společnosti Bruker, s.r.o. Snímky lze kategorizovat do několika skupin podle tvaru kolonizační plochy, dále podle způsobu osvětlení misky a dle použitého typu agaru. Některé kategorie jsou obsáhlejší oproti ostatním a za účelem dosažení co nejvyšší přesnosti segmentace byly vybrány dvě nejčastěji zastoupené barvy agaru v datové sadě, kterými je červený a bílý agar. Pro tento experiment bylo vybráno 170 snímků z každé kategorie (barvy). Následující obrazy jsou příkladem snímků v datové sadě.



Obr. 5.4: Příklad snímků použitých v druhém experimentu

V prvním kroku experimentu byla u každého snímku vysegmentována kolonie, čímž vznikla binární maska obrazu. Tyto masky byly vytvořeny manuálně v programu Masker za pomoci funkcí jako je kouzelná hůlka, případně pomocí volného kreslení, byly označeny buněčné kolonie, čímž byla získána binární maska.

Předzpracování dat

Původní velikost snímku byla 1900×1800 pixelů. Následné trénování probíhalo na grafické kartě Nvidia GTX 1080Ti, vstupní obrázky měly velikost 512×512 pixelů. Aby nedošlo ke ztrátě informace, původní snímky byly rozděleny pomocí vytvořeného skriptu psaného v programovacím jazyku Python na šestnáct čtvercových nepřekrývajících se oblastí o velikosti 512×512 . Tímto způsobem byla vytvořena datová sada, používaná pro trénování modelu tohoto experimentu o celkové velikosti 2720 snímků.

Průběh experimentu

V rámci experimentu byly natrénovány dva modely. První model používal datovou sadu snímků, kde byly kolonie naneseny na červený agar. Druhý model ke trénování používal datovou sadu kolonií nanesených na bílém agaru. Výsledky přesnosti segmentace jednotlivých modelů pak byly zpracovány pro vyhodnocení výsledků druhého experimentu.

Cílem experimentu bylo zjistit, zda se liší přesnost u modelu co používá pro trénování datovou sadu snímků s červeným a zeleným agarem, případně v jakých hodnotách se liší a co může být problémem segmentace buněčných kolonií.

Trénování modelu

Samotné trénování modelů pak probíhalo v programu, který je napsaný v programovacím jazyku Python. Pro práci s modelem hlubokého učení byl použit framework Keras s backendem TensorFlow. Byla použita architektura U-Net, která je popsána výše v práci. Při trénování modelu nebyla použita augmentace dat, každý snímek byl pouze normalizován do hodnot 0 až 1. Míra učení byla nastaven na 0,0001 a jako optimalizační metoda byla použita metoda Adam.

Při trénování modelu byla použita kromě trénovací množiny i validační množina, která sloužila k tomu, aby se zjistilo, zda nedošlo k přetrénování modelu na snímcích z trénovací množiny. Datová sada byla vždy před samotným trénováním náhodně rozdělena na trénovací (70 %), testovací (10 %) a validační (20 %). Po proběhnutí jedné epochy byl model vždy otestován na validační množině, kde se ověřovala jeho přesnost. Celkový počet epoch byl nastaven na hodnotu 100 s tím, že bylo možné dřívejší ukončení, v případě, že nedochází již 10 epoch k zlepšování učení.

5.2.2 Metodika hodnocení

Cílem druhého experimentu je zjistit, jaký je rozdíl v přesnosti segmentace modelu, který využívá k trénování, validaci a testování datovou sadu se snímky buněčných kolonií nanesených na červeném agaru a na bílém agaru. Hodnocení kvality modelů pak probíhá na základě sledování množství falešně pozitivních hodnot, které se nacházejí ve výsledné segmentaci. Další sledovaná metrika je F1 skóre, které je měřítkem přesnosti testu. Vypočítává se z pozitivní prediktivní hodnoty a senzitivity podle vzorce uvedeného v kapitole 4.4.

Na základě výše popsaných hodnot získaných z výsledků segmentace pak bude rozhodnuto, zda má vliv barva agaru, na které je nanesena buněčná kolonie, na přesnost algoritmu. Pokud jeden model bude mít viditelně lepší výsledky (hodnota pozitivně prediktivní hodnoty jiná o 0,1 nebo F1 skóre lišící se o více než 0,1), pak bude prohlášena daná barva agaru za vhodnější pro segmentaci obrazu pomocí používaného modelu.

5.2.3 Výsledky experimentu

Experiment se skládal ze dvou částí. V první byl natrénován model pomocí datové sady, která obsahovala snímky, kde byla buněčná kolonie nanesena na červený agar. V druhé části byl natrénován, jenž ke svému trénování, validaci a testování využívá snímky s mikroorganismy na bílém agaru.

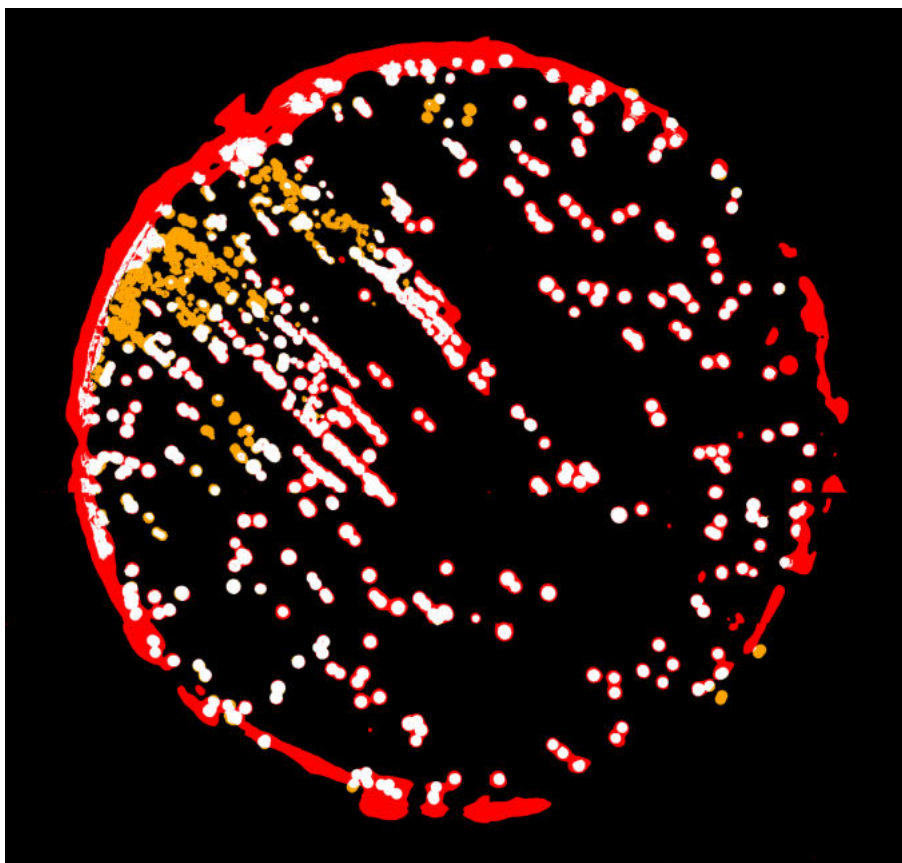
Výsledky experimentu jsou uvedeny v tabulce 5.2, která pro úplnost výsledků zahrnuje nejen F1 skóre a pozitivní prediktivní hodnotu, dle kterých je hodnocena úspěšnost modelu, ale i senzitivitu a přesnost.

	F1 skóre	Přesnost	Senzitivita	Pozitivní prediktivní hodnota
Model č.1	0,921	0,983	0,796	0,740
Model č.2	0,742	0,904	0,893	0,533

Tab. 5.2: Výsledky experimentu č.2

Výsledky experimentu: Model č.1

Výsledek segmentace pomocí prvního modelu obsahujícího datovou sadu snímků s červeným agarem neobsahoval velké množství falešně pozitivních, ani falešně negativních hodnot. Tento jev lze pozorovat i na obrázku 5.5, kde oranžová barva značí falešně negativní hodnoty a červená zobrazuje místa, která byla chybně označena za buněčnou kolonii. Pozitivní prediktivní hodnota je 0,740 a F1 skóre je 0,922. Obě tyto hodnoty jsou ve srovnání i s ostatními experimenty této práce vysoké a segmentaci obrazu tak lze hodnotit jako úspěšnou.



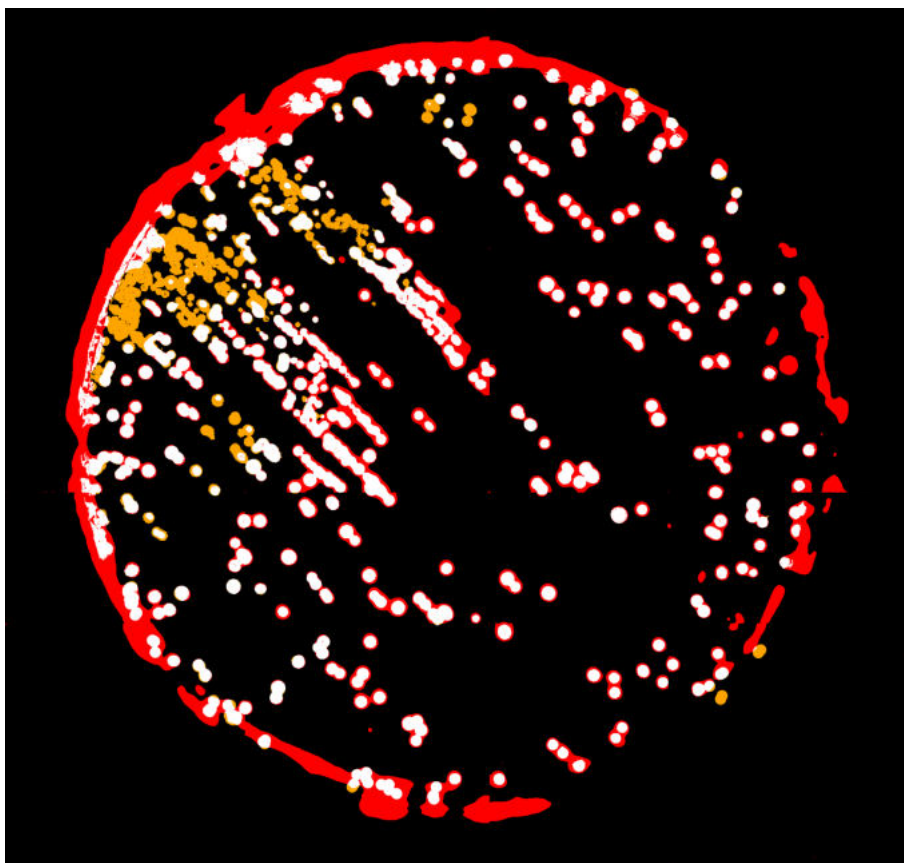
Obr. 5.5: Grafický výstup prvního modelu druhého experimentu

Výsledky experimentu: Model č.2

Druhý model používal k trénování, validaci a testování datovou sadu snímků obsahujících mikroorganismy nanesené na bílém agaru. Při pohledu na snímek lze předpokládat, že segmentace bude kvůli malému kontrastu mezi koloniemi a pozadím obtížnější. Tento předpoklad potvrdily i výsledky segmentace, které obsahovaly velké množství falešně pozitivních výsledků, což se odrazilo i v nízké hodnotě pozitivní prediktivní hodnoty, která je 0,533. F1 skóre, které je měřítkem přesnosti testu, je také nižší než u předchozího modelu, dosáhlo hodnoty 0,742. Grafickou podobu výsledku segmentace lze pozorovat na obrázku 5.6. U tohoto snímku jsou viditelné především falešně pozitivní hodnoty vyznačené červenou barvou, které pak negativně ovlivňují velikost pozitivní prediktivní hodnoty.

5.2.4 Závěr

Z výsledků obou modelů je zřejmé, že datová sada obsahující pouze snímky nanesených buněčných kolonií na červeném agaru vykazuje vyšší přesnost segmentace obrazu. Tento rozdíl může být způsoben tím, že v případě bílého agaru není kontrast



Obr. 5.6: Grafický výstup druhého modelu druhého experimentu

mezi pozadím a buněčnou kolonií vysoký, je tedy obtížnější segmentovat jednotlivé části obrazu. Datová sada s červeným agarem je tedy vhodnější pro segmentaci obrazu pomocí používaného modelu a pro bílý agar by bylo vhodné jej upravit za účelem dosažení vyšší přesnosti nebo v rámci předzpracování obrazů vhodně upravit snímky.

5.3 Experiment 3: Vliv tvaru kolonie

Datová sada obsahuje velké množství snímků různých kolonií, které se od sebe liší tvarem kolonizované plochy. Cílem tohoto experimentu je zjistit, jaký má vliv tvar plochy kolonie na přesnost algoritmu- zda bude model lépe segmentovat některé tvary, nebo bude jeho přesnost podobná.

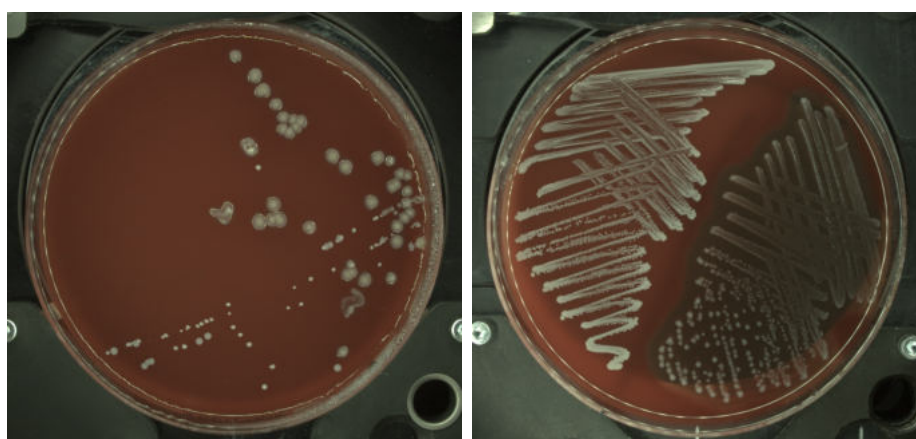
5.3.1 Návrh experimentu

Příprava dat

Obsáhlá datová sada snímků obsahuje 1525 obrazů, které byly získány při testování, verifikaci a validaci již zmíněného přístroje MBT Pathfinder společnosti Bruker, s.r.o. Snímky lze kategorizovat do několika skupin podle tvaru kolonizační plochy, dále podle způsobu osvětlení misky a dle použitého typu agaru. Jejich tvary pak mohou mít vliv na učení modelu, který může segmentovat některé tvary lépe než ty ostatní.

Vzhledem k tomu, že datová sada obsahuje velké množství různých kategorií ploch, všechny nemají dostatečné zastoupení pro optimální natrénování modelu. Byly tedy vybrány dva nejčastější tvary kolonizačních ploch. První tvar jsou oddělené tečky menší velikosti, které jsou separované. Druhá kategorie jsou souvislé plochy (tzv. technika křížového nátěru).

Tyto dva typy byly vybrány i z toho důvodu, že se od sebe výrazně liší. Pro tento experiment bylo do každé kategorie vybráno celkem 168 snímků. Příklad snímků jednotlivých kategorií je uveden na obrázcích 5.7.



Obr. 5.7: Příklad snímků použitých ve třetím experimentu

V prvním kroku experimentu byla u každého snímku vysegmentována kolonie, čímž vznikla binární maska obrazu. Tyto masky byly vytvořeny manuálně v programu Masker za pomoci funkcí jako je kouzelná hůlka, případně pomoci volného kreslení, byly označeny buněčné kolonie, čímž byla získána binární maska.

Předzpracování dat

Původní velikost snímku byla 1900×1800 pixelů. Následné trénování probíhalo na grafické kartě Nvidia GTX 1080Ti, vstupní obrázky měly velikost 512×512 pixelů.

Aby nedošlo ke ztrátě informace, původní snímky byly rozděleny pomocí vytvořeného skriptu psaného v programovacím jazyku Python na šestnáct čtvercových nepřekrývajících se oblastí o velikosti 512×512 . Tímto způsobem byly vytvořeny dvě datové sady, používané pro trénování modelů tohoto experimentu. Každý dataset čítal 2688 snímků.

Průběh experimentu

Experiment probíhal tak, že byly natrénovány postupně dva různé modely. První používal datovou sadu snímků jedné kategorie (tečky) a následně byl natrénován model na datové sadě druhé kategorie (křížový nátěr).

Trénování modelu

Trénování modelů pak probíhalo stejně jako předchozí experimenty v programu, který je napsaný v programovacím jazyku Python. Pro práci s modelem hlubokého učení byl použit framework Keras s backendem TensorFlow. Byla použita architektura U-Net, která je popsána výše v práci. Při trénování modelu nebyla použita augmentace dat, každý snímek byl pouze normalizován do hodnot 0 až 1. Míra učení byla nastaven na 0,0001 a jako optimalizační metoda byla použita metoda Adam.

Při trénování modelu byla použita kromě trénovací množiny i validační množina, která sloužila k tomu, aby se zjistilo, zda nedošlo k přetrénování modelu na snímcích z trénovací množiny. Datová sada byla vždy před samotným trénováním náhodně rozdělena na trénovací (70 %), testovací (10 %) a validační (20 %). Po proběhnutí jedné epochy byl model vždy otestován na validační množině, kde se ověřovala jeho přesnost. Celkový počet epoch byl nastaven na hodnotu 100 s tím, že bylo možné dřívejší ukončení, v případě, že nedochází již 10 epoch k zlepšování učení.

5.3.2 Metodika hodnocení

Úspěšnost modelů třetího experimentu probíhá na základě pozitivní prediktivní hodnoty, což je míra správně identifikovaných pozitivních případů ze všech predikovaných pozitivních případů. Je tedy užitečná, když se ve výsledku segmentace nachází velké množství falešně pozitivních hodnot. Pozitivní prediktivní hodnota je dobrým měřítkem k určení, kdy jsou data na falešné pozitivní výsledky náchylná. Přesná definice této metriky se vzorcem pro její výpočet je uvedena v kapitole 4.4.

Další sledovanou hodnotou tohoto experimentu je senzitivita, která je na rozdíl od pozitivní prediktivní hodnoty důležitý ukazatel v případě, že je ve výsledné segmentaci velké množství falešně negativních hodnot. Přesná definice této metriky je

uvedena v předchozí kapitole 4.4.

Výstupem z tohoto experimentu bude tedy informace, který tvar buněčné kolonie je při segmentaci více a který méně náchylný k falešně pozitivním, či falešně negativním, výsledkům a který tvar kolonizované plochy je lépe segmentovatelný pomocí používaného modelu hlubokého učení.

5.3.3 Výsledky experimentu

V rámci experimentu byly natrénovány dva modely hlubokého učení, kde každý měl speciální datovou sadu o stejném počtu snímků. Výsledky přesnosti modelů jsou uvedeny v tabulce 5.3.

	F1 skóre	Přesnost	Senzitivita	Pozitivní prediktivní hodnota
Model č.1	0,501	0,930	0,534	0,178
Model č.2	0,931	0,930	0,903	0,777

Tab. 5.3: Výsledky experimentu č.3

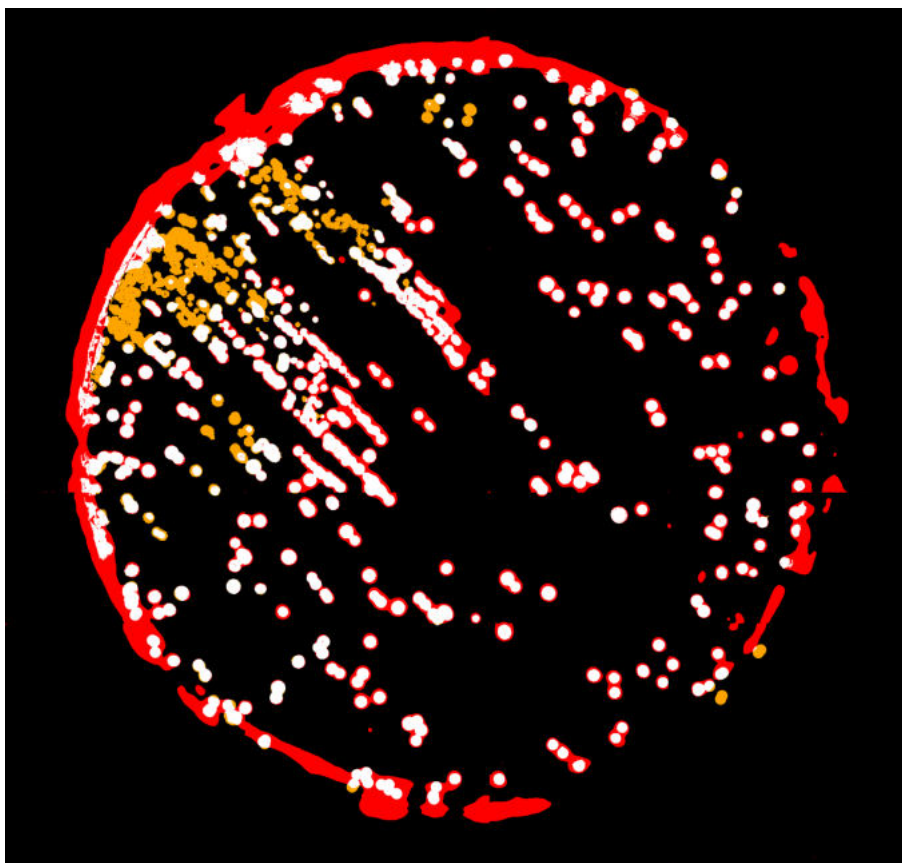
Výsledky prvního modelu

Výsledky segmentace pomocí prvního modelu vykazují velké množství falešně pozitivních případů, hodnota pozitivní prediktivní hodnoty je tedy velmi nízká (0,178). Druhá sledovaná metrika, senzitivita, dosáhla hodnoty 0,534, což znamená, že se ve výsledku objevuje i velké množství falešně negativních hodnot. Grafické výsledky experimentu lze sledovat na obrázku 5.8, kde jsou červeně vyznačeny falešně pozitivní výsledky a oranžová barva značí chybně nesegmentované buněčné kolonie.

Především v okrajích misky lze pozorovat velké množství chybně označených segmentů buněčné kolonie, což může být způsobeno podobnou barvou misky a jejího nejbližšího okolí, jako jednotlivých kolonií. Tento problém odstraňuje následující experiment, který používá na každý snímek před trénováním modelu kruhovou masku zakrývající okolí misky.

Výsledky druhého modelu

Segmentace obrazu pomocí druhého modelu, který využíval pro trénování, validaci a testování datovou sadu snímků obsahující obrázky buněčných mikroorganismů nesených na agar pomocí tzv. křížového nátěru, bylo viditelně úspěšnější než v předchozím případě. Výsledky segmentace nevykazují velké množství falešně pozitivních hodnot, což je viditelné i na grafickém vyobrazení 5.9 a díky tomu je i vyšší pozitivní prediktivní hodnota (0,777), než u předchozího modelu. Senzitivita, jejíž hodnotu



Obr. 5.8: Grafický výstup prvního modelu třetího experimentu

ovlivňuje počet falešně negativních výsledků, je u tohoto modelu také vyšší než u předchozího, dosáhla hodnoty 0,903. Výsledek segmentace tedy neobsahuje ani velké množství falešně negativních oblastí.

Grafické výsledky experimentu lze pozorovat na obrázku 5.9, kde oranžová barva značí falešně negativní případy a červená pak poukazuje na místa, která byly chybně označené za buněčné kolonie.

5.3.4 Závěr

Z obrazů 5.8 a 5.9 je patrné, že problémy se segmentací nastávají především v okrajích buněčných kolonií a na okrajích misky. Co se týká okrajů naneseného mikroorganismu je možná i varianta, že algoritmus segment správně vyznačil, ale vytvořená maska originálnímu snímku nebyla dokonale provedena do kraje buněčné kolonie. Výsledek segmentace byl tedy označen za chybný, přestože segmentace je provedena správně. Problém okrajů misky lze odstranit při použití kruhové masky pouze na Petriho misku, aby bylo odstraněno pozadí a skleněný okraj, který může obsahovat odlesky naneseného mikroorganismu.



Obr. 5.9: Grafický výstup druhého modelu třetího experimentu

Výsledky obou experimentů vykazují, že model lépe segmentuje v případě použití datové sady snímků s křížovým nátěrem než při použití obrazů z datové sady prvního modelu. V druhém modelu tohoto experimentu bylo ve výsledné segmentaci méně falešně pozitivních i negativních hodnot. Celkově lze říct, že souvislé plochy model segmentuje lépe, než separované malé oblasti.

5.4 Experiment 4: Vliv okolí misky

Petriho misky jsou kulatého tvaru, z čehož vyplývá, že pořízený obdélníkový snímek bude obsahovat za okraji kruhové misky pozadí. Přestože jsou misky snímány na nehomogenním podkladu, toto pozadí je neměnné. To znamená, že každá miska ho má stejné trénování modelu by to nemělo výrazně ovlivňovat. Experiment bude testovat, zda bude mít vliv, pokud se použijí celé snímky i s originálním pozadím nebo když se zabarví pozadí misek do černa a tyto snímky se následně použijí ke trénování modelu.

5.4.1 Návrh experimentu

Tento experiment se zabývá vlivem okolí misky na přesnost segmentace modelu hlubokého učení. Z datové sady bylo vybráno 200 snímků, které spadají do stejné kategorie, aby samotné učení neovlivňovalo více parametrů než pozadí misky.

Příprava dat

V prvním kroku experimentu byla u každého snímku vysegmentována kolonie, čímž vznikla binární maska obrazu. Tyto masky byly vytvořeny manuálně v programu Masker za pomoci funkcí jako je kouzelná hůlka, případně pomocí volného kreslení, byly označeny buněčné kolonie, čímž byla získána binární maska.

Předzpracování dat

Původní velikost snímku byla 1900×1800 pixelů. Následné trénování probíhalo na grafické kartě Nvidia GTX 1080Ti, vstupní obrázky měly velikost 512×512 pixelů. Aby nedošlo ke ztrátě informace, původní snímky byly rozděleny pomocí vytvořeného skriptu psaného v programovacím jazyku Python na šestnáct čtvercových nepřekrývajících se oblastí o velikosti 512×512 . Tímto způsobem byly vytvořena datová sada, používaná pro trénování prvního modelu tohoto experimentu. Každá datová sada čítala 3200 snímků.

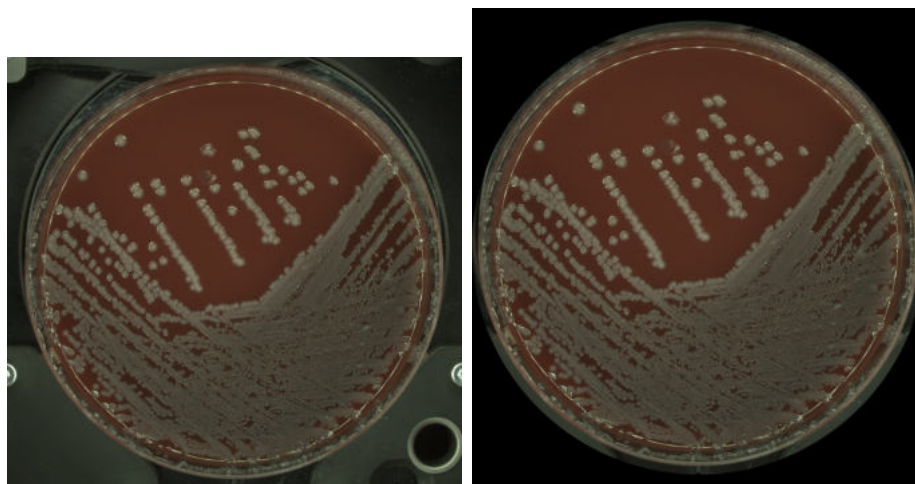
Dalším krokem experimentu bylo vytvoření snímků se začerněným pozadím. Tento proces byl proveden pomocí vytvořeného skriptu v programu Python. Postupně tedy vznikla další datová sada, kde jsou pouze Petriho misky s nanesenými koloniemi a okolí je černé. Pomocí vytvořeného skriptu byly tyto snímky opět rozděleny na šestnáct čtvercových nepřekrývajících se oblastí o velikosti 512×512 . Vznikla tak druhá datová sada s 3200 obrazy.

Průběh experimentu

Experiment probíhal ve dvou fázích. V prvním kroku byl natrénován model hlubokého učení na datové sadě snímků s pozadím a ve druhé fázi pak byla použita datová sada s ořezaným okolím Petriho misky.

Trénování modelu

Trénování modelů pak probíhalo stejně jako v předchozích experimentech v programu, který je napsaný v programovacím jazyku Python. Pro práci s modelem hlubokého učení byl použit framework Keras s backendem TensorFlow. Byla použita architektura U-Net, která je popsána výše v práci. Při trénování modelu nebyla použita augmentace dat, každý snímek byl pouze normalizován do hodnot 0 až



Obr. 5.10: Příklad snímků použitých ve čtvrtém experimentu

1. Míra učení byla nastaven na 0,0001 a jako optimalizační metoda byla použita metoda Adam.

Při trénování modelu byla použita kromě trénovací množiny i validační množina, která sloužila k tomu, aby se zjistilo, zda nedošlo k přetrénování modelu na snímcích z trénovací množiny. Datová sada byla vždy před samotným trénováním náhodně rozdělena na trénovací (70 %), testovací (10 %) a validační (20 %). Po proběhnutí jedné epochy byl model vždy otestován na validační množině, kde se ověřovala jeho přesnost. Celkový počet epoch byl nastaven na hodnotu 100 s tím, že bylo možné dřívejší ukončení, v případě, že nedochází již 10 epoch k zlepšování učení.

5.4.2 Metodika hodnocení

Hodnocení úspěšnosti modelů čtvrtého experimentu probíhá na základě úspěšnosti segmentace skutečně pozitivních oblastí z předpovězených pozitivních, což udává veličina pozitivní prediktivní hodnota. Tato hodnota stanovuje jak úspěšně model dokáže segmentovat kolonie. V případě, že bude u jednoho modelu výrazně vyšší číslo (lišící se o více než 0,1), pak lze usoudit, že je vhodné použití či nepoužití kruhové masky při předzpracování dat. Další pozorovanou hodnotou je F1 skóre.

5.4.3 Výsledky experimentu

Výsledky testování obou modelů jsou uvedeny v tabulce 5.4. Uvedeny jsou čtyři veličiny: F1 skóre, přesnost, senzitivita a pozitivní prediktivní hodnota.

	F1 skóre	Přesnost	Senzitivita	Pozitivní prediktivní hodnota
Model č.1	0,938	0,965	0,840	0,877
Model č.2	0,940	0,965	0,842	0,895

Tab. 5.4: Výsledky experimentu č.4

Výsledky experimentu: Model č.1

První model využíval snímky na které nebyla při předzpracování aplikována kruhová maska. Úspěšnost segmentace skutečně pozitivních oblastí, pozitivní prediktivní hodnota, byla 0,877 a F1 skóre 0,938. Tento model tedy vykazoval velmi dobrou úspěšnost segmentace obrazu.

Výsledky experimentu: Model č.2

Na datovou sadu druhého modelu byla při předzpracování aplikována kruhová maska, která změnila původní nehomogenní pozadí misek na souvislou černou plochu. Při testování modelu byla zjištěna lepší úspěšnost segmentace, než u předchozího modelu. Všechny hodnoty získané z testování byly vyšší, než když maska použita nebyla. F1 skóre se liší pouze o 0,002, ale pozitivní prediktivní hodnota dosáhla 0,895. Model tedy velmi úspěšně detekuje skutečně pozitivní oblasti a velmi málo chybně segmentuje oblasti, které reálně nejsou buněčnými koloniemi.

5.4.4 Závěr

Tento experiment dokázal, že použití kruhové masky při předzpracování dat umožňuje natrénování modelu s vyšší úspěšností a je tedy vhodné tuto techniku použít vždy při předzpracování dat. Originální pozadí misky negativně ovlivňuje segmentaci. Tento jev může být dán tím, že pozadí, zejména skleněný okraj misky, obsahuje oblasti podobající se buněčným koloniím nebo odlesky kolonií a model je tak nesprávně označuje jako oblasti zájmu. Před trénování datové sady, která bude používána při automatizaci transferu bakteriálních kolonií u přístroje Pathfinder společnosti Bruker s.r.o. bude vždy použita kruhová maska, aby se zamezilo zmiňovaným nežádoucím jevům nevhodné segmentace.

5.5 Experiment 5: Vliv rozdělení datové sady při trénování modelu

Datová sady je vždy poměrově rozdělena do tří kategorií: snímky pro trénování, validaci a testování. Tento experiment sleduje, zda bude mít vliv na přesnost modelu

různé rozdělení datové sady do těchto tří skupin.

5.5.1 Návrh experimentu

Příprava dat

Obsáhlá datová sada snímků obsahuje 1525 obrazů ze kterých bylo vyselektováno pro tento experiment pouze 200 snímků náležících do stejné kategorie, aby změna rozdělení datové sady nebyla závislá na tvaru kolonie nebo barvě agaru na kterém je nanesená. Používají se snímky z jedné kategorie kvůli eliminaci vlivu jiných parametrů datové sady.

Těchto 200 snímků je použito pro trénování celkem pěti modelů, pokaždé se model trénuje, validuje a testuje na stejných snímcích, ale snímky jsou jinak rozdělené do těchto tří kategorií. Vznikne tedy pět různých modelů, jejichž výsledné přesnosti segmentace budou následně porovnány.

V prvním kroku experimentu byla vytvořena každému snímku maska. Tyto masky byly vytvořeny ručně v programu Masker. Každý snímek byl otevřen v programu a za pomoci funkcí jako je kouzelná hůlka, případně pomocí volnému kreslení, byly označeny buněčné kolonie, čímž byla získána černobílá maska originálního snímku.

Předzpracování dat

Původní velikost snímku byla 1900×1800 pixelů. Následné trénování probíhalo na grafické kartě Nvidia GTX 1080Ti, vstupní obrázky měly velikost 512×512 pixelů. Aby nedošlo ke ztrátě informace, původní snímky byly rozděleny pomocí vytvořeného skriptu psaného v programovacím jazyku Python na šestnáct čtvercových nepřekrývajících se oblastí o velikosti 512×512 . Tímto způsobem byly vytvořena datová sada, používaná pro trénování prvního modelu tohoto experimentu. Datová sada čítala 3200 snímků.

Průběh experimentu

Experiment tedy probíhal v pěti fázích, kdy byly snímky v dříve zmíněné datové sadě náhodně rozděleny do tří kategorií. Snímky používané pro trénování modelu čítaly jako obvykle 70 % z celkového počtu obrazů, pro validaci bylo použito 20 % snímků a pro testování modelu pak 10 % snímků. Při tomto rozložení dat byl natrénován model a získány výsledky segmentace. V dalším kroku byl stejný dataset opět náhodně rozdělen stejně jako v první fázi experimentu a následně byl natrénován další model. Stejným způsobem byla provedena změna rozdělení datové sady do kategorií ještě třikrát, celkem bylo natrénováno tedy pět modelů.

Trénování modelu

Trénování modelů pak probíhalo stejně jako předchozí experimenty v programu, který je napsaný v programovacím jazyku Python. Pro práci s modelem hlubokého učení byl použit framework Keras s backendem TensorFlow. Byla použita architektura U-Net, která je popsána výše v práci. Při trénování modelu nebyla použita augmentace dat, každý snímek byl pouze normalizován do hodnot 0 až 1. Míra učení byla nastaven na 0.0001 a jako optimalizační metoda byla použita metoda Adam. Celkový počet epoch byl nastaven na hodnotu 100 s tím, že bylo možné dřívejší ukončení, v případě, že nedochází již 10 epoch k zlepšování učení.

5.5.2 Metodika hodnocení

Jednotlivé části experimentu (modely) budou srovnány na základě F1 skóre. V případě, že se jeho hodnota bude lišit u jednotlivých modelů o více než 0,05, pak rozdělení datové sady na trénovací, testovací a validační množinu ovlivňuje přesnost experimentu. V případě, že by nastala taková situace, bude vhodné při dalších experimentech provádět vždy křížovou validaci. V opačném případě nebude nutné tuto techniku využívat a lze datovou sadu pouze jednou náhodně rozdělit do podmnožin.

5.5.3 Výsledky experimentu

Kompletní výsledky experimentu jsou uvedeny v tabulce 5.5.3, která uvádí získané metriky po testování jednotlivých modelů. Výsledky úspěšnosti segmentace jednotlivých modelů se od sebe výrazně neliší. Zejména F1 skóre, které je primární sledovanou hodnotou, má rozptyl od 0,932 (model č.2) do 0,940 (model č.1), což udává maximální rozdíl pouze 0,08.

	F1 skóre	Přesnost	Senzitivita	Pozitivní prediktivní hodnota
Model č.1	0,940	0,965	0,842	0,895
Model č.2	0,932	0,930	0,903	0,877
Model č.3	0,935	0,938	0,910	0,886
Model č.4	0,937	0,890	0,949	0,890
Model č.5	0,933	0,950	0,886	0,892

Tab. 5.5: Výsledky experimentu č.5

5.5.4 Závěr

Experiment sledoval úspěšnost modelů při použití stejné datové sady a jejím různým rozdělením na trénovací, validační a testovací množinu. Po testování jednotlivých

modelů bylo zjištěno, že jejich úspěšnost se výrazně neliší. Různé rozdělení datové sady tedy nemá vliv na úspěšnost experimentu a není nutné zahrnovat do předzpracování dat techniky řešící tuto problematiku. Je vhodné jednou náhodně rozdělit datovou sadu, kterou je možné přímo použít pro trénování modelu.

5.6 Finální zhodnocení výsledků

První experiment zabývající se velikostí datové sady definuje, že pro získání úspěšného modelu s hodnotou F1 skóre alespoň 0,6 je nutné použít k trénování, validaci a testování modelu alespoň 4496 snímků. V případě, že by bylo žádoucí vyšší F1 skóre, je nutné získat pro experiment větší množství snímků a znovu ho provést. Tímto by se zjistilo, jestli lze dosáhnout vyšších hodnot této veličiny. Přestože v datové sadě pro tuto práci nebylo možné využít pro experiment více snímků, při dalším testování a verifikace přístroje MBT Pathfinder dojde k zvětšení datové sady a experiment bude zopakován.

Další dva experimenty se soustředily na rozdělení datové sady do kategorií a rozdílnosti úspěšnosti modelů při jejich použití pro trénování, validaci a testování. Bylo zjištěno, že model lépe segmentuje buněčné kolonie nanesené na červeném agar. Snímky misek s bílým agarem by bylo vhodné předzpracovat změnou kontrastu nebo jiným zpracováním obrazu k dosažení lepší segmentace oblastí zájmu. Bylo také zjištěno, že model lépe segmentuje souvislé plochy než malé oddělené oblasti.

Čtvrtý experiment používal při předzpracování snímků jedné datové sady kruhovou masku, která nahradila nehomogenní pozadí souvislou černou plochou. Díky tomuto se pak zlepšila úspěšnost modelu a je tedy vhodné toto předzpracování používat pro každý snímek, který bude dál používán.

Poslední experiment dokázal, že nezáleží na různém rozdělení na trénovací, validační a testovací množinu stejné datové sady. Náhodné rozdělení datové sady bylo provedeno pětkrát a bylo natrénováno pět modelů. Po otestování jednotlivých modelů byly získány výsledky, které splňovaly stanovený povolený rozdíl úspěšnosti. Stačí tedy jednou náhodně rozdělit datovou sadu a není nutná křížová validace před trénováním modelu.

Díky výsledkům z jednotlivých experimentů lze vytvořit datovou sadu s ideálními parametry pro algoritmus sloužící k automatizaci procesu segmentace obrazu, který bude využívat přístroj MBT Pathfinder společnosti Bruker, s.r.o. Poznatky k ideální datové sadě byly předány a spolu s optimálním algoritmem budou v praxi využity.

Závěr

Tato diplomová práce se zabývala vlivem datové sady na přesnosti algoritmu hlubokého učení. V první části byla provedena lineární rešerše, která se soustředila na definici různých pojmů. Na začátku byla vysvětlena biologická podstata struktur, nacházejících se na snímcích, se kterými algoritmus pracuje. Práce pokračuje shrnutím klasických segmentačních technik a segmentace s využitím strojového učení, které je možné používat pro zpracování snímků Petriho misek. V teoretické části je také věnována kapitola samotnému vlivu parametrů datové množiny na výsledek trénování modelů strojového učení.

Na základě poznatků z rešerše bylo stanoveno pět experimentů sledujících vliv parametrů trénovací množiny na úspěšnost modelu na testovací množině. Než bylo možné začít model učit, musela se pro trénování sítě vytvořit jednotlivým snímkům maska. Tento proces proběhl v programu Masker, kde byla každému obrázku vytvořena binární maska.

Díky výsledkům z jednotlivých experimentů lze vytvořit datovou sadu s parametry, které přispějí dosažení vysoké úspěšnosti modelu. První experiment definuje, že pro hodnotu F1 skóre alespoň 0,6 je nutné použití více než 4496 snímků v datové sadě. Tento experiment bude vhodné provést s větší datovou sadou a zjistit, zda by se s více snímky úspěšnost modelu zvyšovala. Díky dalšímu testování vyvíjeného přístroje MBT Pathfinder se získá více obrazů a experiment bude zopakován. Druhý a třetí experiment definoval úspěšnosti u různých kategorií a výstupem je námět na předzpracování snímků misek, kde byl použit bílý agar, za účelem zvýšení kontrastu a tím dosažení možného zlepšení úspěšnosti modelu. Čtvrtý experiment používal při předzpracování snímků jedné datové sady kruhovou masku, která nahradila nehomogenní pozadí souvislou černou plochou. Změna pozadí na homogenní měla za výsledek zvýšení úspěšnosti modelu a je tedy vhodné toto předzpracování používat pro každý snímek, který bude dál používán. Poslední experiment se věnoval různému rozdělení datové sady na trénovací, validační a testovací množinu. Při pěti náhodných zařazení snímků datové sad do podmnožin a následném natrénování modelů se jednotlivé výsledky úspěšnosti výrazně nelišily, takže lze rozdělit datovou sadu náhodně pouze jednou a s těmito podmnožinami následně pracovat.

Poznatky ze všech experimentů budou použity pro vytvoření datové sady s parametry, které budou zajišťovat natrénování modelu s aktuálně nejpreciznější možnou segmentací. Algoritmus bude poté používán pro výběr kolonie a její následný transport na MALDI destičku, který je součástí přístroje MBT Pathfinder společnosti Bruker, s.r.o. Díky vytvoření trénovací množiny s ideálními parametry je algoritmus úspěšnější při segmentaci obrazu a samotný přístroj je tedy schopný přesnějšího výběru buněčných kolonií.

Literatura

- [1] AHERN, Holly. *Microbiology: A Laboratory Experience* New York: Open SUNY Textbooks, 2018. ISBN 978-1-942341-54-3
- [2] AICHLER, Michaela, WALCH, Axel. *MALDI Imaging mass spectrometry: current frontiers and perspectives in pathology research and practice*. Germany: Lab Invest, 2015. DOI 10.1038/labinvest.2014.156.
- [3] ALAKE, Richmond. *Deep Learning: GoogLeNet Explained* [online]. Towards data science, 2020 [cit. 10.11.2020].
- [4] ARYAL, Sagar. *MacConkey Agar- Composition, Principle, Uses, Preparation and Colony Morphology* [online]. Microbiology info, 2018 [cit. 10.11.2020].
- [5] BAKER, Matthew A.B., CHAN, Herbert Hsein, NICHOLS, James. *Machine learning: applications of artificial intelligence to imaging and diagnosis* [online]. Springer, 2019 [cit. 10.11.2020]. DOI: 10.1007/s12551-018-0449-9
- [6] BONNET, Martin, LAGIER, Jean-Christophe., RAOULT, Didier, KHELAI-FIA, Saber. *Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology* [online]. Elsevier, 2019 [cit. 10.11.2020]. DOI: 10.1016/j.nmni.2019.100622
- [7] BROWNLEE, Jason. *A Gentle Introduction to Early Stopping to Avoid Overtraining Neural Networks* [online]. Machine Learning Mastery, 2018 [cit. 15.5.2021].
- [8] BROWNLEE, Jason. *Supervised and Unsupervised Machine Learning Algorithms* [online]. Machine Learning Mastery, 2016 [cit. 15.10.2020].
- [9] BUSHAEV, Vitaly. *Adam- Latest trends in deep learning optimization* [online]. Towards Data science, 2018 [cit. 12.12.2020].
- [10] CHAKRABORTY, Papri, PRADEEP, Thalappil. *The emerging interface of mass spectrometry with materials* [online]. NPG Asia Materials, 2019 [cit. 15.10.2020]. DOI: 10.1038/s41427-019-0149-3.
- [11] CHOWDHARY, Chiranj, ACHATJYA, DebiprasadPriyabrata. *Segmentation and Feature Extraction in Medical Imaging: A Systematic Review* [online]. Elsevier, 2020 [cit. 18.12.2020]. ISSN: 1877-0509
- [12] CHEN, Haoye. *Semantic visual localization for visually impaired people* [online]. Karlsruhe Institute of Technology, 2020 [cit. 15.5.2021]. DOI: 10.13140/RG.2.2.11786.80320.

- [13] DESHPANDE, Adit. *A Beginner's Guide To Understanding Convolutional Neural Networks* [online]. UCLA CS, 2016 [cit. 18.12.2020].
- [14] HAYA, Alasakar. *Convolutional Neural Network Application in Biomedical Signals* [online]. Journal of Computer Science and Information Technology, 45-49, 2018 [cit. 15.11.2020], DOI: 10.15640/jcsit.v6n2a5.
- [15] HE, Kaiming, SUN, Jian, ZHANG, Xiangyu, ZOU, Jianhua. *VGG - Convolutional Network for Classification and Detection* [online]. Cornell University, 2015 [cit. 15.11.2020]. DOI: 1505.06798.
- [16] HORLOCK, Claire. *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)* [online]. Imperial College London, 2020 [cit. 15.11.2020].
- [17] HORWATH, James, P., ZAKHAROV, Dmitri, N., MÉGRET, Rémi, STACH, Eric, A. *Understanding important features of deep learning models for segmentation of high-resolution transmission electron microscopy images* [online]. Nature, 2020 [cit. 12.10.2020]. DOI: 10.1038/s41524-020-00363-x.
- [18] *How Deep Learning Powers up Microbiology Labs for Faster, More Accurate Results* [online]. 2018 cit[12.10.2020].
- [19] JAN, Jiří, LAMOŠ, Martin, WALEK, Petr. *Analýza biomedicínských obrazů počítačová cvičení*. Brno, 2013, IBSN: 978-80-214-4792-9.
- [20] KAUSHIK, Rikiya, NISHIO, Mizuho, TOGASHI, Kaori. *Convolutional neural networks: an overview and application in radiology* [online]. Springer, 2019 [cit. 12.10.2020]. DOI: 10.1007/s13244-018-0639-9.
- [21] KAUSHIK, Ravi, KUMAR, Shailender. *Image Segmentation Using Convolutional Neural Network*. [online]. International journal of scientific and technology research, vol.8., 2019 [cit. 1.5.2021]. ISSN: 2277-8616.
- [22] KEENLEYSIDE, Wendy. *Microbiology: Canadian edition* [online]. Pressbooks, 2020 [cit. 15.10.2020].
- [23] KONSTANTIN, Tretyakov. *The Mystery of Early Stopping* [online]. Four years, 2017 [cit. 15.5.2021].
- [24] KOSTRZEWA, Markus, SCHUBERT, Soren. *MALDI-TOF MS in the Microbiology Laboratory: Current Trends* [online]. Curr Issues Mol Biol., 2017, 23:17-20 [cit. 15.10.2020]. DOI: 10.21775/cimb.023.017.
- [25] KUDĚLKOVÁ, Monika. *Růst a množení mikroorganismů v přítomnosti azo barviv*. [online]. Brno, 2017 [cit. 15.10.2020].

- [26] LOPEZ-RIBOT, Jose, L., RAMASUBRAMANIAN, Anad, K., SRINIVASAN, Anad. *Microscale microbial culture. Future Microbiol* [online]. Journal ListHHS Author Manuscripts, 2016, 143-146 [cit. 15.10.2020]. DOI: 10.2217/fmb.14.129.
- [27] MathWorks *What is deep learning* [online]. 2020 [cit. 15.10.2020].
- [28] MEDKOVÁ, J., SEDLÁŘOVÁ, M. *Metody identifikace mikroorganismů* [online]. 2007 [cit. 15.10.2020].
- [29] *Methods of Classifying and Identifying Microorganisms* [online]. Boundless Microbiology, 2018 [cit. 15.10.2020].
- [30] MISHRA, Divyanshu. *Transposed Convolution Demystified* [online]. Towards data science, 2020 [cit. 15.5.2021].
- [31] NING, Huang, LI, Zhenlong, WANG, Cuizhen, YANG, Lina. *Choosing an appropriate training set size when using existing data to train neural networks for land cover segmentation* [online]. Annals of GIS, 2020 [cit. 15.10.2020]. DOI: 110.1080/19475683.2020.1803402.
- [32] PASZKE, Adam, CHAURASIA, Abhoshek, KIM, Sangpil, CULURCIELLO, Eugenio. *Enet: A deep neural network architecture for real-time semantic segmentation* [online]. Cornell University, 2019 [cit. 1.5.2021]. DOI: 1606.02147, 2016
- [33] PRABHAKARAN, Selva. *Confidence Interval- Fully Explained* [online]. ML+, 2020 [cit. 20.11.2020].
- [34] PURKRTOVÁ, Sabina. *Přehled rychlých metod stanovení mikroorganismů: biochemické, imunochemické, fyzikální metody* [online]. VŠCHT, 2017 [cit. 15.11.2020].
- [35] RONNEBERGER, Olaf, FISCHER, Philipp, BROX, Thomas. *U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation* [online]. University of Freiburg, 2015 [cit. 1.5.2021]. DOI: 1505.04597v1.
- [36] RUDER, Sebastian. *An overview of gradient descent optimization algorithms* [online]. Cornell University, 2016 [cit. 1.5.2021]. ArXiv: 1609.04747.
- [37] RUIZ, Pablo. *Understanding and visualizing ResNets* [online]. Harvard University, 2018 [cit. 1.5.2021].
- [38] SANDLE, Tim. *Pharmaceutical Microbiology* [online]. Woodhead Publishing, 2016 [cit. 15.10.2020]. ISBN: 978-0-08-100022-9.

- [39] *Sensitivity, specificity, PPV and NPV* [online]. Geeky medics, 2019 [cit. 20.11.2020].
- [40] SHORTEN, Connor, KHOSHGOFTAAR, Taghi, M. *A survey on Image Data Augmentation for Deep Learning* [online]. Journal of Big Data, 2019, 60 [cit. 25.11.2020]. DOI: 10.1186/s40537-019-0197-0
- [41] SHUNG, Koo, Ping. *Accuracy, precision, recall or F1?* [online]. Towards Data Science, 2018 [cit. 15.10.2020].
- [42] TODDAR, Kenneth. *Todar's online textbook of bacteriology* [online]. University of Wisconsin, 2020.
- [43] WANG, Liyun, FAN, Daming, CHEN, Wei, TERENCEV, Eugene, M. *Bacterial growth, detachment and cell size control on polyethylene terephthalate surfaces* [online]. Sci Rep, 2015 [cit. 15.10.2020]. DOI: 10.1038/srep15159
- [44] WEI, Jerry. *AlexNet: The Architecture that Challenged CNNs* [online]. Towards Data Science, 2019 [cit. 1.5.2021].

Seznam symbolů, veličin a zkratk

ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization - laserová desorpce za účasti matrice
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization - Time of Flight - laserová desorpce za účasti matrice v kombinaci s detektorem doby letu
TOF	Time of Flight - doba letu